



PCT/FR2004/002627

REC'D 28 DEC 2004
WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 14 SEP. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Martine Planche', is enclosed in a stylized oval.

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE
17.1. a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 02
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY

26 bis, rue de Saint Petersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

► N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réserve à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

17 OCT 2003

LIEU

69 INPI LYON

0312190

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

17 OCT. 2003

Vos références pour ce dossier
(facultatif) AC/DL BFF 03P0374 (R03133)

Confirmation d'un dépôt par télécopie

N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet



Demande de certificat d'utilité



Demande divisionnaire



Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de
brevet européen Demande de brevet initiale



N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Procédé de transformation d'époxydes porteurs de groupes trifluorométhyle

**4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

Personne morale

Personne physique

Nom
ou dénomination sociale

RHODIA CHIMIE

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile
ou
siège

Rue

26 Quai Alphonse Le Gallo

Code postal et ville

92100 BOULOGNE-BILLANCOURT

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété Intellectuelle - Livre VI

cerfa

N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 030103

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES		Réervé à l'INPI
DATE		17 OCT 2003
LIEU		69 INPI LYON
N° D'ENREGISTREMENT		0312190
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		COLOMBET
Nom		COLOMBET
Prénom		Alain
Cabinet ou Société		CABINET LAVOIX
N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	2 Place d'Estienne d'Orves
	Code postal et ville	[7 5 14 14 11] PARIS CEDEX 09
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01 53 20 14 20
N° de télécopie (facultatif)		01 53 20 14 91
Adresse électronique (facultatif)		
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt
		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques
		<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
CABINET LAVOIX Mandataire : Alain COLOMBET CPI N° 95-0306		 

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 2.../2...

BR/SUITE

Réserve à l'INPI

REMISE DES PIÈCES
DATE 17 OCT 2003
LIEU 69 INPI LYON

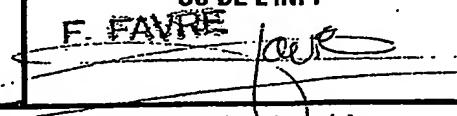
0312190

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 @ W /210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		AC/DL BFF 03P0374 (R03133)	
4.1 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date	N°
		Pays ou organisation Date	N°.
		Pays ou organisation Date	N°
5. DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale	<input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S)	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		[]	
Code APE-NAF		[]	
Domicile ou siège	Rue	3 Rue Michel Ange	
	Code postal et ville	17 5171914 PARIS CEDEX 14	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		01 44 96 40 00	
N° de télécopie (facultatif)		01 44 96 49 07	
Adresse électronique (facultatif)			
5. DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale	<input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		[]	
Code APE-NAF		[]	
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville	[]	
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
11. SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		CABINET LAVOIX Mandataire Alain COLOMBET CPI N° 95-0306	
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  	

La présente invention a pour objet un procédé d'hydrolyse des époxydes fluorés comportant un ou plusieurs groupements CF₃, et plus particulièrement un procédé permettant de traiter un mélange d'énanthiomères (R) et (S) de tels époxydes fluorés, de manière à enrichir le mélange en l'un des énanthiomères de cet époxyde et à obtenir en 5 parallèle le diol vicinal correspondant à l'autre énanthiomère. Elle a en particulier pour objet un procédé permettant la séparation des énanthiomères (R) et (S) et plus particulièrement un procédé permettant l'enrichissement en isomère de configuration absolue (S) et en diol de configuration (R), ou inversement, l'enrichissement en isomère de configuration absolue (R) et en diol de configuration (S). L'invention a aussi pour objet un procédé permettant de 10 produire les énanthiomères et/ou les diols vicinaux sous forme énanthopure ou énanthiomériquement enrichie.

Une autre application de ce procédé est la biohydrolyse non énanthioselective d'un époxyde racémique ou non racémique.

Les époxydes sont des intermédiaires très importants en synthèse organique car ils 15 possèdent une grande réactivité. Ils combinent en effet l'intérêt de posséder une tension de cycle importante et d'avoir un atome d'oxygène nucléofuge. La présence d'un carbone asymétrique conduit à des molécules possédant deux formes stéréoisomériques (énanthiomères) distinctes, la forme (R) et la forme (S), l'une étant l'image de l'autre dans un miroir. Il peut être important, dans certains cas, de disposer uniquement de l'une de ces 20 formes et il convient alors de disposer de moyens pour séparer ces deux stéréoisomères ou pour synthétiser spécifiquement le stéréoisomère désiré.

Les molécules fluorées ont un positionnement intéressant aussi bien en agrochimie qu'en pharmacie. L'accès aux époxydes et diols vicinaux fluorés de configuration (R) ou (S) présente donc un intérêt, notamment en temps qu'intermédiaire de synthèse de ces 25 molécules fluorées.

L'utilisation de champignons microscopiques et de protéines d'origine fongique a été décrite comme pouvant servir à la séparation des stéréoisomères de certains époxydes.

Ainsi, EP-A-0 611 826 décrit un procédé de production d'époxydes optiquement enrichis utilisant des champignons microscopiques choisis dans divers genres. Suivant le 30 champignon utilisé, la réaction permet de préparer la forme (R) ou la forme (S) d'un époxyde.

WO-A-0068394 décrit l'isolement, le clonage et la sur-expression d'une enzyme dite époxyde hydrolase à partir d'un champignon du genre *Aspergillus* et l'utilisation de cette époxyde hydrolase pour la préparation de molécules énanthiomériquement enrichies à partir de mélanges d'isomères de composés époxydes décrits en des termes très généraux. Une 35 étude réalisée sur l'oxyde de para-nitrostyrène a révélé une plus forte affinité et une constante catalytique de l'enzyme supérieure pour l'énanthiomère (R) par rapport à l'énanthiomère (S), conduisant à l'hydrolyse rapide de l'isomère (R) en son diol

correspondant. Ce document divulgue la séquence protéique et la séquence nucléotidique de l'époxyde hydrolase d'un champignon *Aspergillus niger*, ce qui permet à ce document de proposer la production de l'enzyme par génie génétique.

Comme le rappelle le document EP-A-0 611 826, il existe de nombreuses classes 5 d'époxydes. Le procédé est exemplifié dans ce document sur un nombre restreint de composés, à savoir l'oxyde de 3-chlorostyrène, le glycidol, l'allyl glycidyl éther, le 3,4-époxy-1-butène, le 1,2-époxyhexane, le 2,3-époxypropylebenzène et l'oxyde de styrène, alors que la variété des époxydes et des groupements réactifs qu'ils sont susceptibles de porter, est très vaste.

Une activité époxyde hydrolase, et en particulier une activité époxyde hydrolase 10 énantiométrique, sur des époxydes comportant un ou plusieurs groupes CF₃ n'a jamais été démontrée. Compte tenu du caractère particulier des époxydes comportant un ou plusieurs groupes CF₃, en particulier du fait de l'électronégativité importante du fluor, il était notoirement impossible à l'homme du métier de prévoir la réactivité et la spécificité d'une 15 enzyme particulière selon l'invention par rapport à ce type de substrat.

La présente invention a donc pour objectif principal de proposer un procédé permettant l'hydrolyse d'époxydes porteurs de motifs trifluorométhyle.

Elle a plus particulièrement pour objet un tel procédé permettant la séparation des 20 énantiomères (R) et (S) d'époxydes porteurs de motifs trifluorométhyle à partir d'un mélange -racémique ou non racémique- d'énantiomères dudit époxyde.

Un autre objectif de l'invention est de proposer un tel procédé utilisable pour la 25 préparation d'époxydes ou de diols comme intermédiaires pour la synthèse de produits pharmaceutiques, agrochimiques ou phytosanitaires.

Les demandeurs ont pu démontrer pour la première fois que des époxydes porteurs 30 de motifs trifluorométhyle peuvent être hydrolysés avec ouverture de l'époxyde et formation d'un diol, et en outre que ces époxydes peuvent être séparés de manière énantiométrique, en utilisant une époxyde hydrolase telle que celle d'*Aspergillus niger* LCP521. Ceci leur a permis de mettre au point un procédé permettant la transformation énantiométrique 35 d'époxydes -racémiques ou non racémiques- à CF₃, basé sur l'emploi de cette époxyde hydrolase ou d'une protéine ou polypeptide analogue ayant une activité époxyde hydrolase sur des époxydes à motif trifluorométhyle.

Suivant une variante de l'invention, et comme on le verra *infra*, la transformation peut 35 être conduite dans des conditions qui ne sont pas ou peu énantiométriques, et cette variante peut être mise à profit pour une hydrolyse non ou peu énantiométrique d'époxydes.

La présente invention a donc pour objet un procédé d'hydrolyse d'un époxyde fluoré comportant un ou plusieurs groupes CF₃, de préférence un époxyde de formule (I) telle que décrit ci-après, procédé dans lequel on traite l'époxyde en présence d'eau avec une protéine ayant une activité époxyde hydrolase (EH) sur les époxydes à CF₃ de manière à induire
5 l'ouverture de l'époxyde et la formation du diol vicinal. L'époxyde peut être un isomère (R) ou (S), ou un mélange, racémique ou non racémique, de ces isomères.

La présente invention a plus particulièrement pour objet un procédé permettant de transformer un mélange d'énanziomères (R) et (S) d'un époxyde fluoré comportant un ou plusieurs groupes CF₃, de préférence un époxyde de formule (I), en un mélange enrichi en
10 l'un des isomères et en diol correspondant à l'autre isomère, procédé dans lequel on traite:
(A) un mélange d'énanziomères (R) et (S) de l'époxyde selon l'invention avec (B) une protéine ayant une activité époxyde hydrolase (EH) sur les époxydes à CF₃, le procédé conduisant à l'ouverture préférentielle soit de l'époxyde (R) en diol (R) soit de l'époxyde (S)
en diol (S).

15 Par définition, l'ouverture d'un époxyde par une molécule d'eau est dite « préférentielle », en ce sens que la protéine a une affinité et une constante catalytique supérieures pour l'un des énanziomères par rapport à l'autre, ce qui se traduit par une vitesse d'hydrolyse supérieure de cet énanziomère. Il est donc possible, en contrôlant la réaction d'hydrolyse, notamment en stoppant cette réaction au moment opportun, d'obtenir à
20 un instant donné une composition enrichie en époxyde (R) ou (S) et en diol de configuration absolue opposée.

Le procédé selon l'invention conduit généralement à une réaction de dédoublement dans laquelle un énanziomère de l'époxyde de configuration (R) ou (S) est ouvert pour donner le diol correspondant. L'époxyde hydrolase conforme à l'invention peut donc induire
25 une hydrolyse énaniosélective de ces époxydes particuliers, dans des proportions remarquables et inattendues. La transformation a un caractère d'énaniosélectivité particulièrement intéressant lorsque le coefficient d'énaniosélectivité (E) (voir *infra*) est supérieur ou égal à 10, de préférence supérieur ou égal à 30. En fonction du substrat époxyde, l'EH peut hydrolyser préférentiellement soit l'isomère (R), soit l'isomère (S). Il
30 s'avère qu'avec la majorité des époxydes, l'EH hydrolyse préférentiellement l'isomère (R).

Par convention, dans le présent exposé, les termes ou expressions « enzyme », « enzyme à activité époxyde hydrolase » et « protéine à activité époxyde hydrolase » sont synonymes et sont employés indifféremment.

Le procédé peut comporter une étape subséquente de séparation de l'époxyde (S) du
35 diol (R) ou inversement la séparation de l'époxyde (R) du diol (S), de manière à récupérer d'une part une composition énanziomériquement enrichie en époxyde et d'autre part une composition enrichie en diol. Avec une hydrolyse préférentielle de l'isomère (R), l'étape de

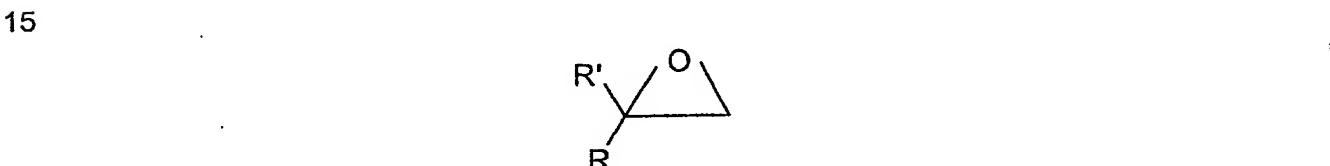
séparation conduit à récupérer une composition enrichie en époxyde (S) et une composition enrichie en diol (R). Avec une hydrolyse préférentielle de l'isomère (S), l'étape de séparation conduit à récupérer une composition enrichie en époxyde (R) et une composition enrichie en diol (S). On peut procéder au besoin à au moins un autre traitement de la composition enrichie en époxyde par l'enzyme, puis extraction et séparation.

La composition enrichie en diol (R) ou (S) peut être soumise à une cyclisation du diol (R) ou (S) en époxyde (R) ou (S), puis au besoin à au moins un autre traitement par l'enzyme, suivi d'une nouvelle cyclisation.

L'objectif de traitements successifs (2 ou plus) est d'améliorer au besoin l'excès énantiomérique de l'énantiomère correspondant.

Définition des époxydes

Les époxydes visés par l'invention comportent un ou plusieurs groupes CF_3 , de préférence de 1 à 3, et de manière préférée, ils répondent à la formule (I) :



dans laquelle :

- le groupe R représente un groupe alkyle, alcényle, cycloalkyle, aryle ou aralkyle, éventuellement substitué par alkyle, alcoxy, alkylthio ou halogène; les substituants alkyle, alcoxy, alkylthio comportant une chaîne hydrocarbonée en C_1-C_6 , de préférence en C_1-C_3 , linéaire, ramifié ou cyclique et comportant éventuellement un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F ;
 - le groupe R' représente H ou un alkyle linéaire, ramifié ou cyclique en C_1-C_{10} , de préférence en C_1 , C_2 ou C_3 et comportant éventuellement un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F ;
 - étant entendu que l'un au moins des radicaux R et R' est, ou comporte, un ou plusieurs, de préférence de 1 à 3, groupements trifluorométhyle (CF_3) ;
- 25 avec (B) une protéine ayant une activité époxyde hydrolase (EH) sur les époxydes à CF_3 .

30 Suivant un mode de réalisation préféré, l'époxyde de formule (I) est tel que R' est H ou un alkyle linéaire en C_1 , C_2 ou C_3 , mieux encore R' est H ou alkyle en C_1 éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogènes, de préférence F, par exemple substitué par 3 atomes de F.

Les groupes R peuvent comporter de 1 à 20 C, notamment de 1 à 12 C.

Lorsque R est un alkyle substitué par un halogène, R peut être CF₃.

Les groupes R peuvent être substitués par de 1 à 3 groupes choisis parmi trifluorométhyle, trifluorométhoxy et trifluorométhylthio.

Les groupes alkyles R peuvent être linéaires ou ramifiés. Ils comportent de préférence de 1 à 10 C, plus préférentiellement de 1 à 6 C. Par exemple : méthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, pentyle, isopentyle, hexyle ou isohexyle, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F. De préférence, le groupe alkyle R comporte de 1 à 3 groupements CF₃.

Les groupes cycloalkyle R comportent de préférence de 3 à 10 C, de préférence de 3 à 8 C, mieux encore 5 à 7 C. Par exemple : cyclopropyle, cyclobutyle, cyclopentyle, cyclohexyle ou cyclooctyle, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F. De préférence, le groupe cycloalkyl R comporte de 1 à 3 groupements CF₃.

Les groupes aryle R peuvent être par exemple les groupes phényle et naphtyle, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F. De préférence, le groupe aryle R comporte de 1 à 3 groupements CF₃. Les groupes phényle ainsi substitués sont des modalités préférées.

Les groupes aralkyle R peuvent notamment comprendre de 7 à 18 C. A titre d'exemples, on peut citer les groupes benzyle, 1-méthylbenzyle, 2-phényléthyle, 3-phénylpropyle, 4-phénylbutyle, 1-naphtylméthyle, 2-naphtylméthyle, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F. De préférence, le groupe aralkyle R comporte de 1 à 3 groupements CF₃.

Les époxydes comportant un radical R phényle comportant un groupe phényle portant de 1 à 3, de préférence 1 ou 2 groupements CF₃, éventuellement trifluorométhoxy ou trifluorométhylthio sont des modalités préférées de l'invention. On peut encore préciser que ces groupements peuvent être en para, ortho ou méta par rapport au carbone du phényle relié à l'oxirane. On préfère cependant une substitution en para ou méta, et plus préférentiellement encore en para. Ces époxydes préférés, peuvent encore comporter une gem-disubstitution avec un R' choisi de préférence parmi les alkyles en C₁-C₃, de préférence CH₃. Ces époxydes peuvent aussi être éventuellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F. Plusieurs exemples intéressants de phénol-oxiranes substitués par CF₃ en positions 2, 3, 4 et 3,5, ou substitués par -O-CF₃ ou -S-CF₃ en position 4, R' étant H ou CH₃, sont décrits dans les exemples.

35 L'époxyde hydrolase

Une protéine ayant une activité époxyde hydrolase (EH) sur les époxydes à CF₃ est représentée par la protéine ayant pour séquence en acides aminés la séquence décrite à la

SEQ ID NO : 2. Cette protéine est l'époxyde hydrolase de l'*Aspergillus niger* enregistrée au Museum d'Histoire Naturelle (Paris) sous le numéro LCP521 (Laboratoire de Cryptogamie, 12 rue Buffon, 75005 Paris, France). Cette protéine a été décrite dans la publication WO-A-00 68394, à laquelle l'homme du métier peut se référer au besoin. Cette protéine constitue pour les besoins de la présente invention, la protéine de référence, et constitue en même temps un mode de réalisation préféré.

La protéine peut aussi être un « variant », « homologue », ou « dérivé » de la protéine de référence, qui par définition présente, comme la protéine de référence, une activité EH sur un époxyde à CF₃, et de préférence une activité biologique au moins identique, similaire ou analogue à la protéine de référence sur le même substrat.

Dans le cas d'application à une hydrolyse énantiomériste, les protéines préférées sont celles présentant pour un substrat donné, un coefficient d'énantiomériste E supérieur ou égal à 10, de préférence à 30, de manière plus préférée à 50, et mieux encore à 100 , le coefficient d'énantiomériste E étant défini par la formule suivante:

$$15 \quad E = \frac{\ln [(1-c)(1-ee_s)]}{\ln [(1-c)(1+ee_s)]}$$

avec c : taux de conversion

ee_s : excès énantiomérique du substrat résiduel après hydrolyse enzymatique.

La présente invention définit ci-après, et met en œuvre dans les exemples, un procédé dit monophasique et un procédé dit biphasique, qui correspondent à deux modes de réalisation. L'activité EH de la protéine de référence, comme celle d'un « variant », « homologue », ou « dérivé », peut être évaluée pour un substrat donné, sur la base de ces procédés, et une comparaison peut être réalisée entre les performances de la protéine de référence et celles de la ou des autres protéines testées.

On peut aussi faire l'évaluation d'une protéine EH (protéine de référence, « variant », « homologue », ou « dérivé ») en reproduisant le test suivant : 5,0 mg de substrat époxyde sont dissous dans 3 mL de DMSO ; on ajoute 3 µL de 3-(trifluorométhyl)-acétophénone (étalon interne) et 7,9 mL d'eau distillée ; une solution enzymatique est préparée : par exemple, 2 mg d'extrait enzymatique de l'EH à évaluer (pureté de l'ordre de 25%) sont dissous dans 2,320 mL d'eau distillée ; les solutions sont placées à 27°C pendant 30 min ; on ajoute ensuite 100 µL de solution enzymatique au milieu réactionnel ; des prélèvements réguliers du milieu réactionnel permettent de suivre au cours de la réaction la formation du diol : 400 µL du milieu réactionnel sont ajoutés à 200 µL d'acétonitrile ; après agitation au vortex, extraire par 400 µL d'isoctane ; pour chaque prélèvement la phase organique est injectée en GC chirale pour mesurer l'excès énantiomérique de l'époxyde résiduel et la

phase aqueuse est injectée sur HPLC phase inverse pour doser la formation du diol (Colonne Nucleodur Chrompack ; Eluant : $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 60/40 ; débit 0.5 mL.min⁻¹ ; $\lambda = 264$ nm ; injection 30 μL) ; on a par cette méthode accès aux paramètres ee et c, ce qui permet de calculer la valeur de E ; on a aussi accès à l'activité (diol formé). Une comparaison peut 5 être réalisée entre les performances de la protéine de référence et celles de la ou des autres protéines testées.

Suivant un mode de réalisation avantageux, un tel test, ou un test similaire e.g. élaboré à partir de la présente description, permet de déterminer, dans un panel d'au moins 10 deux protéines à activité EH, celle (ou celles) qui s'avère la plus performante sur un substrat donné. Plus largement, un tel test ou un test similaire permet de déterminer les protéines, les « variants », « homologues », et « dérivés » aptes à conduire, pour un substrat donné, à un coefficient E supérieur ou égal à 10, de préférence à 30. La présente invention permet donc à l'homme du métier de sélectionner l'enzyme la mieux adaptée au substrat qu'il souhaite transformer. Un tel test ou un test similaire permet aussi à l'homme du métier d'évaluer 15 l'impact de modifications apportées à la séquence de l'enzyme, e.g. à la séquence SEQ ID NO : 2, et donc notamment de pouvoir évaluer les modifications et mutations faites à des fins d'amélioration des performances de l'enzyme.

De manière tout à fait préférée, la protéine possède une activité EH sur un époxyde à CF_3 qui est identique ou sensiblement identique à l'époxyde hydrolase de référence.

20 Comme on le verra *infra*, une telle protéine peut être d'origine naturelle, provenant par exemple d'un organisme du genre *Aspergillus*, d'un autre champignon microscopique ou de toute autre source vivante (bactérie, levure, plante etc.) ou encore d'origine synthétique ou recombinante. Une protéine d'origine naturelle peut avoir été modifiée pour donner une protéine ou un polypeptide dérivé synthétique ou recombinant.

25 Les protéines « variantes », « homologues », ou « dérivées » peuvent être définies comme comprenant :

i. les séquences ayant un pourcentage d'homologie égal ou supérieur à 40 %, de préférence à 80 %, de manière plus préférée à 85 %, de manière encore plus préférée à 90 %, et mieux encore à 95, 96, 97, 98 ou 99 % avec la SEQ ID NO : 2, 30 la protéine ainsi définie ayant une activité EH sur les époxydes à CF_3 ;

ii. les séquences comprenant au moins 10, de préférence au moins 20, de manière plus préférée au moins 50 ou 100 acides aminés consécutifs de la SEQ ID NO : 2 ou d'une séquence telle que définie sous i, la protéine ainsi définie ayant une activité EH sur les époxydes à CF_3 .

35 Suivant un mode de réalisation préféré, l'invention emploie une telle protéine « variante », « homologue », ou « dérivée » qui présente pour un substrat donné, un coefficient d'enantiosélectivité E supérieur ou égal à 10, de préférence à 30.

Le terme "homologie" se réfère de préférence à l'identité entre les acides aminés comparés.

Cette notion d'homologie peut aussi prendre en compte les substitutions « conservatives » qui sont des substitutions d'acides aminés de même classe, telles que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la sérine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique), d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, lalanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine), ces substitutions par des acides aminés similaires ne portant pas significativement atteinte à l'activité biologique de la protéine de référence, et conduisant de préférence à une protéine conservant ou accroissant l'activité biologique de la protéine de référence

Plus généralement, par « séquence d'acides aminés variante, homologue, ou dérivée », on entend donc toute séquence d'acides aminés qui diffère de la séquence de référence par substitution, délétion et/ou insertion d'un acide aminé ou de plusieurs acides aminés, cette séquence constituant une protéine ou un polypeptide ayant une activité EH sur des époxydes à CF₃, les modifications ne portant pas significativement atteinte à l'activité biologique de la protéine de référence, et de préférence conservant l'activité biologique de la protéine de référence ou accroissant l'activité biologique par rapport à la protéine de référence

Il peut donc s'agir d'une protéine ou polypeptide comprenant ou essentiellement constitué d'un fragment de la SEQ ID NO : 2 ou d'une séquence telle que définie sous i, par exemple d'un fragment formé par les acides aminés 1-339 ou une séquence homologue.

L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Blast Software, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, USA ; ou Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité ou similitude). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces (« gaps ») dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des deux séquences comparées sont identiques ou similaires, par rapport au nombre total de positions.

De préférence, les protéines ou polypeptides « variants », « homologues », ou « dérivés » sont de même longueur ou sensiblement de même longueur que les séquences de référence.

Sont également considérés comme homologues les variants alléliques issus ou 5 dérivés de souches de microorganismes, e.g. d'*A. niger*, qui ont une activité biologique similaire à la protéine de référence.

Conformément à l'invention, les protéines ou polypeptides peuvent être par ailleurs modifiés chimiquement ou enzymatiquement pour améliorer leur stabilité ou leur biodisponibilité.

10

Production de l'époxyde hydrolase

Suivant un premier mode de réalisation, la protéine est apportée sous la forme d'une préparation concentrée et/ou purifiée, obtenue à partir d'une culture d'un microorganisme producteur, notamment champignon microscopique, e.g. *A. niger*, en particulier LCP521. On

15 parle alors de protéine « naturelle ». Une telle préparation peut être obtenue par une étape d'extraction de l'enzyme à partir d'une culture cellulaire, e.g. par lyse mécanique (par exemple passage dans une presse de French) ou chimique (y compris enzymatique), suivie d'une étape d'élimination des débris cellulaires et de récupération de la phase liquide, ce qui peut comprendre une étape de centrifugation (de préférence à faible vitesse, e.g. de l'ordre 20 de 10 000 g) et/ou de filtration appropriée, avec récupération du surnageant de centrifugation ou du filtrat. On préfère ensuite concentrer l'enzyme, e.g. par ultrafiltration. Il est également préféré de procéder à une purification de l'enzyme et cela peut être effectué par des méthodes de chromatographie, notamment par passages successifs sur des colonnes d'échange d'ions et/ou d'exclusion, comme par exemple DEAE-Sepharose, Phényl-Sepharose, Mono Q et Superose 12, etc. Typiquement, la préparation est issue d'une extraction, suivie de centrifugation, récupération du surnageant, puis concentration et de préférence purification. Le microorganisme producteur peut être modifié par génie génétique 25 pour sur-exprimer l'enzyme, comme décrit *infra*.

Suivant un deuxième mode de réalisation, la protéine est une protéine dite 30 « recombinante », et cette protéine recombinante peut éventuellement être sous forme de protéine fusion. Une protéine recombinante peut être produite par un procédé dans lequel un vecteur contenant un acide nucléique codant pour la protéine est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression de la protéine correspondante. La protéine recombinante produite peut ensuite être récupérée et purifiée.

35 De telles protéines peuvent être produites dans des systèmes eucaryotes ou procaryotes suivant les techniques usuelles de biologie moléculaire, microbiologie et de l'ADN recombinant, qui sont parfaitement connues de l'homme du métier. Ces techniques

sont expliquées en détail dans la littérature. On peut se référer par exemple à : Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein "Sambrook et al., 1989") ; DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985) ; 5 Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984) ; Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985) IRL Press, Oxford] ; Transcription and Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1984) IRL Press, Oxford] ; Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)] ; Immobilized Cells and Enzymes [IRL Press, (1986)] ; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984) ; F.M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols 10 in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Ce mode de réalisation prévoit l'expression de la protéine, dans les cellules hôtes eucaryotes ou procaryotes, à partir d'une séquence nucléotidique codant pour cette protéine. Une telle séquence nucléotidique (ou acide nucléique) est notamment représentée par :

(a) une séquence nucléotidique comprenant la séquence nucléotidique 15 représentée à la SEQ ID NO : 1 (qui code pour l'EH ayant la séquence SEQ ID NO : 2, c'est-à-dire pour la protéine de référence) ;

(b) une séquence nucléotidique qui code pour l'EH ayant la séquence d'acides 20 aminés SEQ ID NO : 2 ;

(c) une séquence nucléotidique qui diffère de la séquence selon (a) ou (b) par 25 dégénérescence du code;

ou par une séquence nucléotidique codant pour une protéine « variante », « homologue », ou « dérivée », notamment comme défini supra, et par exemple :

(d) une séquence nucléotidique s'hybridant à une séquence selon (a), (b) ou (c), 30 et codant pour une protéine ayant une activité EH sur les époxydes à CF₃ ;

(e) une séquence nucléotidique ayant un pourcentage d'identité égal ou 35 supérieur à 45 %, de préférence à 80 %, de manière plus préférée à 85 %, de manière encore plus préférée à 90 %, et mieux encore à 95, 96, 97, 98 ou 99 % avec la SEQ ID NO : 1, et codant pour une protéine ayant une activité EH sur les époxydes à CF₃ ;

(f) un fragment d'une séquence nucléotidique selon (a), (b), (c), (d) ou (e), 40 comprenant au moins 30, de préférence au moins 60, de manière plus préférée au moins 150 ou 300 nucléotides consécutifs, et codant pour une protéine ayant une activité EH sur les époxydes à CF₃.

Les protéines ainsi codées ont une activité EH sur un époxyde à CF₃, et de préférence 45 une activité biologique au moins identique, similaire ou analogue à la protéine de référence sur le même substrat. Dans le cas d'application à une hydrolyse énantiomérisélective, les

protéines préférées sont celles présentant pour un substrat donné, un coefficient d'enantiosélectivité E supérieur ou égal à 10, de préférence à 30.

Suivant la caractéristique d), la séquence nucléotidique peut être une séquence nucléotidique s'hybridant à une séquence selon (a), (b) ou (c), et codant pour une protéine ayant une activité EH sur les époxydes à CF₃; les conditions d'hybridation sont de préférence des conditions de stringence élevées, terme dont la définition est bien connue de l'homme du métier, qui peut se référer aux ouvrages généraux tels que Sambrook et al., 1989 et Hames & Higgins (1985) *supra*.

En ce qui concerne la caractéristique e), l'identité entre séquences nucléotidiques est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Blast Software ou Sequence Analysis Software Package mentionnés *supra*) qui tient compte des nucléotides qui diffèrent entre deux séquences comparées et des nucléotides manquants sur l'une des deux séquences. La valeur de pourcentage est donnée à partir du nombre de nucléotides identiques sur le nombre total de nucléotides de la séquence de référence.

Une séquence nucléotidique homologue inclut donc toute séquence nucléotidique qui diffère de la séquence SEQ ID NO : 1 par mutation, insertion, délétion ou substitution d'une ou plusieurs bases, ou par la dégénérescence du code génétique, pour autant qu'elle code pour un peptide présentant l'activité EH sur des époxydes à CF₃. Les modifications ne portant pas significativement atteinte à l'activité biologique de la protéine de référence, et de préférence conservant l'activité biologique de la protéine de référence ou accroissant l'activité biologique par rapport à la protéine de référence.

Suivant un mode de réalisation préféré, il est fait usage de la séquence nucléotidique suivant la caractéristique (a) ou (b), plus préférentiellement encore suivant la caractéristique (a). Il peut aussi s'agir d'une séquence comprenant ou constituée essentiellement d'un fragment d'une telle séquence (a) ou (b), par exemple nucléotides 1-1197.

Comme cela est parfaitement connu en soi (voir références *supra*), la séquence nucléotidique peut être insérée dans un vecteur d'expression, dans lequel elle est liée de manière opérante à un ou des élément(s) permettant son expression ou la régulation de son expression, tels que notamment des promoteurs, activateurs et/ou terminateurs de transcription.

Les signaux contrôlant l'expression des séquences nucléotidiques (promoteurs, activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié

par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation ou la précipitation au phosphate de calcium.

Les cellules hôtes peuvent être transfectées de manière transitoire ou stable, par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des 5 cellules hôtes, procaryotes ou eucaryotes, d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réPLICATION et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Des exemples de cellules hôtes incluent notamment des cellules de mammifères, telles que les cellules COS-7, 293, MDCK, des cellules d'insectes telles que les cellules SF9, 10 des bactéries telles que *E. coli* et des souches de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou des champignons filamentueux comme *Aspergillus niger*.

Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. La protéine recombinante obtenue peut être purifiée à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en 15 combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux spécifiques, etc.

Une époxyde hydrolase recombinante correspondant à l'enzyme de *A. niger* LCP521 est commercialement disponible sous la référence « Epoxide Hydrolase, *Aspergillus niger* sp., recombinant from *Aspergillus niger* », BioChemika, catalogue Fluka, code 71832.

20 La protéine à activité EH peut encore être produite par synthèse chimique. A cet effet, on peut recourir à n'importe quelle méthode bien connue de l'homme du métier. Le peptide de l'invention peut par exemple être synthétisé par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de 25 spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires non désirés et pour sa facilité de production.

Pour son usage dans le procédé de transformation de l'invention, la protéine peut être en solution ou immobilisée sur un support solide approprié, tel que par exemple le 30 DEAE cellulose ou le DEAE Sepharose, Eupergrit ou Eupergrit modifié (C. Mateo et al., *Org. Biomol. Chem.*, 1, 2739-2743 (2003)).

On peut encore utiliser directement dans le procédé, des cellules entières du champignon tel que *Aspergillus niger*, modifié génétiquement de manière à sur-exprimer l'époxyde hydrolase 35 à un niveau satisfaisant. Ceci peut être réalisé en insérant, de manière opérante dans le génome du champignon, une ou plusieurs cassettes d'expression contenant la séquence codante définie plus haut, sous la dépendance d'un ou des élément(s) permettant son

expression ou la régulation de son expression, tels que notamment des promoteurs, activateurs et/ou terminateurs de transcription. On peut aussi choisir de modifier le niveau d'expression du gène codant pour l'époxyde hydrolase, par exemple par insertion d'un promoteur hétérologue fort et/ou un activateur pour contrôler le gène *in situ*. Enfin, on peut 5 aussi introduire dans le champignon un vecteur d'expression non intégratif, comme décrit supra. Comme décrit supra, un tel microorganisme recombiné peut aussi être utilisé pour la production d'enzyme *in vitro*, auquel cas le procédé d'extraction de l'enzyme produite est ensuite mis en œuvre.

10 Conditions du procédé de transformation

Le substrat époxyde à transformer est de préférence mis en solution dans un solvant, de préférence organique, approprié. Le substrat peut être un époxyde racémique ou un époxyde non racémique.

15 Suivant un premier mode de réalisation, le solvant du substrat est un solvant organique miscible à l'eau et le procédé est dit « monophasique ». Ce solvant est par définition capable de dissoudre le substrat époxyde et est compatible avec l'enzyme (le solvant ne dégrade pas notablement l'enzyme ni son activité d'époxyde hydrolase vis-à-vis de l'époxyde à CF₃). Le substrat peut être employé en toute concentration, dans les limites 20 de sa solubilité dans le solvant.

Des exemples de solvants pour le système monophasique comprennent le DMSO (diméthylsulfoxyde), le DMF (diméthylformamide), l'acétone, le THF (tetrahydrofurane), le dioxane, le propanol. Les solvants préférés sont le DMSO, le DMF (diméthylformamide) et l'acétone. Deux ou plus de ces solvants peuvent être employés en mélange.

25 La méthode comprend ensuite le mélange de la solution de substrat et de l'enzyme, de préférence de l'enzyme en solution tamponnée et de préférence dans l'eau.

L'enzyme isolée est de préférence employée en solution aqueuse, notamment de l'eau, e.g. eau distillée et/ou purifiée. De ce fait, lorsqu'elle se présente sous forme solide, e.g. pulvérulente, elle est d'abord dissoute dans la solution aqueuse.

30 Les concentrations optimales en enzyme peuvent être déterminées pour chaque substrat et peuvent varier dans d'assez larges proportions. De manière générale, on peut travailler en système monophasique avec de faibles concentrations en enzyme, par exemple de l'ordre de 1 à 60 mg d'enzyme par litre de milieu réactionnel, de préférence de 5 à 30 mg/l.

35 Pour chaque substrat il est possible de contrôler en continu la durée de la réaction d'hydrolyse. Pour un nouveau substrat, une étude préliminaire expérimentale permet d'accéder aux paramètres de contrôle. L'énanriosélectivité de la réaction d'hydrolyse par

l'enzyme est due à une plus forte affinité et une constante catalytique supérieure pour l'énanthiomère (R) par rapport à l'énanthiomère (S), ou selon le cas pour l'énanthiomère (S) par rapport à l'énanthiomère (R). Les deux énanthiomères peuvent être hydrolysés, mais la vitesse d'hydrolyse de l'un des énanthiomères étant considérablement supérieure, le contrôle de la 5 durée de la réaction permet de piloter la réaction. Il est donc bien évident que l'homme du métier est à même de déterminer facilement les conditions de durée optimales pour un substrat donné. Ceci peut être réalisé en réalisant des prélèvements réguliers du milieu réactionnel sur lesquels on évalue l'évolution de l'excès énanthiomérique (ee) et le taux de conversion (c). Les exemples donnent un mode opératoire utilisant de l'acétonitrile pour 10 arrêter la réaction (*voir infra*) dans chaque échantillon prélevé et une extraction à l'isoctane pour passage en chromatographie en phase gazeuse (CPG). Si la durée de la phase d'hydrolyse peut varier dans de larges proportions en fonction notamment du substrat considéré et de la concentration en enzyme, on peut néanmoins préciser à titre indicatif que la durée de la phase d'hydrolyse pourra être généralement comprise entre 10 et 300 min, de 15 préférence entre 25 et 80 minutes.

L'arrêt de la réaction de transformation peut être réalisé par tout moyen chimique ou physique approprié, comme par exemple: ajout d'un solvant toxique pour l'EH (acétonitrile par exemple); addition de base ou d'acide, de détergent, de sels etc.; ou encore par congélation, chauffage, micro-onde, microfiltration etc.

20 Suivant un deuxième mode de réalisation, le solvant du substrat est un solvant organique qui n'est pas miscible à l'eau et le procédé est dit « biphasique ». Ce solvant est par définition capable de dissoudre le substrat époxyde et est compatible avec l'enzyme (le solvant ne dégrade pas notablement l'enzyme ni son activité d'époxyde hydrolase vis-à-vis 25 de l'époxyde à CF₃).

Ces solvants non miscibles à l'eau peuvent être choisis parmi les alcanes, par exemple l'iso-octane et l'hexane, les cycloalcanes (cyclohexane par exemple) et les aromatiques (toluène par exemple). Deux ou plus de ces solvants peuvent être employés en mélange.

30 Dans ce deuxième mode de réalisation, une modalité particulière consiste à utiliser en plus un solvant organique miscible à l'eau, notamment un solvant tel que défini pour le système monophasique.

Dans ce deuxième mode de réalisation, une émulsion est de préférence formée à partir de la solution d'époxyde et de la solution d'enzyme. L'émulsion peut être formée au 35 moment du mélange entre la solution de substrat (phase organique) et une solution aqueuse de l'enzyme (phase aqueuse). Il est aussi possible de former une pré-émulsion par mélange de la solution de substrat (phase organique) avec de l'eau ou une solution aqueuse

appropriée, cette émulsion étant ensuite mélangée à la solution aqueuse de l'enzyme. Les moyens de mélange sont tels qu'une émulsion peut se former.

Les substrats époxyde ont en général des coefficients de solubilité supérieurs dans les solvants organiques utilisés dans ce mode de réalisation que dans une solution aqueuse contenant des solvants miscibles à l'eau du mode monophasique. La concentration en époxyde peut donc être supérieure, et par exemple être comprise entre 1 et 1000 g d'époxyde par litre de milieu réactionnel, de préférence entre 10 et 500 g/l.

La phase organique représente avantageusement de 1 à 60 %, de préférence de 5 à 50 % du volume total de l'émulsion. Les ratios compris entre 1 et 20%, de préférence entre 5 et 15 %, sont principalement utilisés lorsque la concentration en époxyde dans le milieu réactionnel est inférieure ou égale à 100 g/l. Au-dessus, on utilise préférentiellement les ratios compris entre 20 et 60 %, de préférence entre 20 et 40 %.

La concentration en enzyme dans la phase aqueuse peut varier dans de larges proportions. Elle se situe entre 0,002 et 3 g d'enzyme pure par litre et de préférence entre 0.002 et 0.5 g/L.

Dans ce mode de réalisation biphasique, il est aussi possible de déterminer à l'avance et/ou de contrôler en continu la durée de la réaction d'hydrolyse pour un substrat donné. Comme décrit *supra*, ceci peut être réalisé en effectuant des prélèvements réguliers du milieu réactionnel sur lesquels on évalue l'évolution de l'excès énantiomérique et le taux de conversion. Les exemples donnent un mode opératoire utilisant de l'acétate d'éthyle et un passage en CPG, que l'on peut appliquer sur chaque échantillon prélevé pour suivre l'évolution de la réaction. La durée de la phase d'hydrolyse peut varier dans de larges proportions, en fonction des conditions opératoires, notamment de la quantité d'enzyme mise en œuvre, et du substrat à transformer. On peut néanmoins préciser que la durée de la phase d'hydrolyse pourra être généralement comprise entre quelques minutes, e.g de l'ordre de 15 à 30 minutes, et plusieurs jours.

L'arrêt de la réaction de transformation peut être réalisé par tout moyen adapté, tel que ajout d'acétate d'éthyle, d'éther éthylique, de dichlorométhane, etc., ou encore par les moyens et techniques mentionnés pour le système monophasique.

30

Dans le procédé de l'invention, et notamment dans les deux modes de réalisation qui viennent d'être décrits, la température lors de la phase d'hydrolyse est généralement maintenue entre 4 et 50°C, de préférence entre 25 et 30 °C .

La phase d'hydrolyse est conduite dans un réacteur approprié muni de moyens d'agitation ou de mélange adaptés. Les paramètres de mélange ou d'agitation sont choisis pour optimiser la phase d'hydrolyse. Suivant une modalité particulière, il est procédé à un contrôle continu ou à intervalles réguliers des conditions d'agitation, notamment de la vitesse

de rotation des moyens d'agitation. Dans le système bi-phasique, ce contrôle permet notamment d'assurer le maintien du milieu réactionnel sous la forme d'une émulsion appropriée.

Suivant une modalité préférée, l'agitation est maintenue tout au long de la phase 5 d'hydrolyse.

Le pH peut être maintenu entre 6 et 9, de préférence entre 6,5 à 7,5.

Des co-réactifs peuvent être utilisés pour accroître la stabilité de l'EH. On peut citer à titre préféré des agents de réduction tels que le β -mércaptoéthanol ou la cystéine.

A l'issue de la phase d'hydrolyse, le substrat (mélange d'époxyde et de diol) peut être 10 extrait par des méthodes classiques connues de l'homme du métier, comme par exemple l'extraction directe ou l'extraction en continu etc.

A partir du produit de l'hydrolyse, éventuellement d'un extrait de celui-ci, l'époxyde résiduel et le diol peuvent être séparés par des méthodes classiques connues de l'homme du métier, par exemple par distillation ou chromatographie sur colonne etc. Des opérations 15 de ce type sont détaillées par exemple dans l'exemple numéro 23.

Comme mentionné *supra*, le diol énantiomériquement enrichi peut être cyclisé en son époxyde. Pour la cyclisation du diol (R) ou (S), on peut utiliser toute méthode connue. A titre d'exemple, la cyclisation peut être réalisée en deux étapes, par ajout de 1 équivalent de 20 chlorure de tosyle (TsCl) en présence de tétrahydrofurane (THF), puis d'hydrure de sodium (NaH). L'opération d'hydrolyse énantiomérique et de cyclisation peut être reconduite une ou plusieurs fois, de façon à accroître l'excès énantiomérique en époxyde (R) ou (S) ou en diol.

La présente invention permet donc de préparer des mélanges comportant de forts excès énantiomériques en époxyde (S) et diol (R), [ou inversement en époxyde (R) et diol (S)] des préparations à fort excès énantiomérique en époxyde (S), [ou inversement en époxyde (R)] des préparations à fort excès énantiomérique en diol ou en époxyde (R) [ou 25 inversement (S)]. Ces préparations peuvent être énantiopures ou essentiellement énantiopures, i.e. présenter un excès énantiomérique supérieur ou égal à 97%.

La présente invention a donc aussi pour objet l'utilisation d'une protéine à activité EH sur un époxyde à CF_3 conforme à l'invention, pour la préparation de tels mélanges et 30 préparations, à partir d'un époxyde racémique ou non racémique. Suivant une mode de réalisation préféré, l'époxyde hydrolase de l'*Aspergillus niger* LCP521 est utilisée, par exemple une protéine d'extraction, une protéine recombinante ou une protéine produite par synthèse chimique. Suivant un autre mode de réalisation, on utilise une protéine d'une autre origine, ou un « variant », « homologue » ou « dérivé » de l'époxyde hydrolase de l'*Aspergillus niger* LCP521, qui a une activité EH sur un époxyde à CF_3 , et de préférence une 35 activité biologique identique, similaire ou analogue à l'époxyde hydrolase de l'*Aspergillus niger* LCP521 sur le même substrat, voire une activité EH supérieure à cette dernière. De

manière préférée, cette protéine à activité EH présente pour un substrat donné, un coefficient d'enantiosélectivité E supérieur ou égal à 10, de préférence à 30.

5 Suivant un autre mode de réalisation, l'hydrolyse est non ou peu énantiosélective. L'invention peut alors concerner entre autres un procédé d'hydrolyse non énantiosélective d'un mélange racémique ou non racémique, d'époxyde en diol procédé dans lequel la réaction est conduite en système monophasique ou biphasique comme décrit *supra*. Suivant une modalité particulière, on transforme un époxyde racémique en diol racémique. Ce
10 procédé peut être conduit de manière remarquable, dans des conditions expérimentales particulièrement douces et économiques, évitant en particulier l'utilisation d'un milieu acide ou basique minéral plus ou moins concentré. La sélection d'une protéine à activité EH peut être facilement réalisée sur la base du test décrit *supra*, ou d'un test similaire, l'objectif étant cette fois de déterminer et sélectionner les protéines conduisant, pour un substrat donné, à
15 un coefficient E inférieur à 10.

Certains des époxydes et diols selon l'invention sont des intermédiaires utiles comme intermédiaires de synthèse de composés pharmaceutiquement actifs. Un autre objet de l'invention est donc l'application du procédé selon l'invention pour la préparation d'intermédiaires de synthèse de composés pharmaceutiquement actifs ou pour la
20 préparation de tels composés pharmaceutiquement actifs, se présentant sous la forme époxyde et/ou diol, de préférence sous la forme époxyde (R) ou (S), de préférence énantiopure ou énantiomériquement enrichie (i.e. présentant un excès énantiomérique supérieur ou égal à 97%), ou sous la forme diol (R) ou (S), de préférence énantiopure ou énantiomériquement enrichie (i.e. présentant un excès énantiomérique supérieur ou égal à
25 97%).

Plus généralement, l'invention s'applique à la production de produits d'intérêt industriel doués d'activité biologique, ou d'intermédiaires de tels produits, par exemple dans les domaines phytosanitaires et agrochimiques, e.g. produits insecticides, anti-parasitaires, etc.

30 Comme composés pharmaceutiquement actifs pouvant être obtenus à partir des époxydes et des diols selon l'invention, on peut citer par exemple :

- BRL-35113 (CAS 90730-95-3) ;
- Clofuperol Hydrochloride (CAS 17230-8764)
- S-15511 (AN-2000-47942 ; J. Pharmacol. Exp. Ther. 295, N°2, 753-60, 2000) ;
- 35 - Aprepitant (CAS 170729-80-3) ;
- Flumaxedol Hydrochloride ($C_{11}H_{13}ClF_3NO$) ;
- Iralukast (CAS 15181-24-7 ; Novartis AG) ;

- Mabuterol Hydrochloride ($C_{13}H_{19}Cl_2F_3N_2O$) ;
- Oxaflozane Hydrochloride (CAS 26629-86-7) ;
- S-15261 (AN-94-44449 ; Diabetologia 37, N°10, 969-75, 1994) ;
- Fludorex (CAS 15221-81-5) ;
- 5 - Flumetramide (CAS 7125-73-7) ;
- Fluminorex (CAS 720-76-3) ; et
- L-709210, L-732138, L-733060, L-636281, L-740141, L-741671, L-742311, L-742694,
ou L-758298 (Merck&Co Inc).

10 L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide d'exemples d'application non limitatifs.

Exemples

15 Dans les exemples qui suivent, l'enzyme utilisée est l'époxyde hydrolase d'*A. niger* (EH d'An) de la souche LCP521. Cette enzyme est une protéine recombinante produite dans une souche d'*Aspergillus niger* conformément au procédé décrit sous la partie B) « Clonage et caractérisation de l'époxyde hydrolase soluble d'*Aspergillus niger* qui est apparentée aux époxydes hydrolase microsomaux de mammifère » dans WO-A-00 68394. Une enzyme ainsi produite est commercialement disponible comme mentionné *supra*.

20 **Résolution cinétique par l'EH d'An – Système monophasique**

Exemple 1

25 *Résolution cinétique du 4-(trifluorométhoxy-phényl)-oxirane par l'EH d'An – Système monophasique*

30 5,1 mg de 4-(trifluorométhoxy-phényl)-oxirane sont dissous dans 3 mL de DMSO. On ajoute 3 μ L de 3-(trifluorométhyl)-acétophénone (étalon interne) et 7,9 mL d'eau distillée ($[4$ -
(trifluorométhoxy-phényl)-oxirane] $=2,5$ mM ; %DMSO=30). Une solution enzymatique est préparée : 2 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'An recombinante (caractérisée comme ayant une pureté de l'ordre de 25%) sont dissous dans 4,550 mL d'eau distillée. Les solutions sont placées à 27°C pendant 30 min. On ajoute ensuite 100 μ L de solution enzymatique au milieu réactionnel.

35 Des prélèvements réguliers du milieu réactionnel permettent de suivre au cours de la réaction l'excès énantiomérique du substrat résiduel et son taux de conversion (400 μ L du milieu réactionnel sont ajoutés à 200 μ L d'acétonitrile. Après agitation au vortex, extraire par

400 µL d'iso-octane et injecter 2µL de la phase organique sur CPG chirale). Les valeurs obtenues correspondent à une valeur du coefficient d'énantiosélectivité E apparent de 30.

Le coefficient d'éenantiosélectivité E est défini comme étant :

5

$$E = \frac{\ln [(1-c)(1-e_{es})]}{\ln [(1-c)(1+e_{es})]}$$

Avec c : taux de conversion

e_{es} : Excès énantiomérique du substrat résiduel après hydrolyse enzymatique.

10

Analyses réalisées sur une colonne type Chirasil-Dex CB ($T=120^{\circ}\text{C}$; $tr=4,4$ min et 4,8 min pour les deux énantiomères de l'époxyde ; $tr=3,9$ min pour l'étalon interne)

Exemple 2

- 15 La procédure décrite dans l'exemple 1 est appliquée au 2-(trifluorométhyl-phényl)-oxirane (4,7 mg soit [2-(trifluorométhyl-phényl)-oxirane] =2,5 mM), en présence de 25 % de DMSO. La solution enzymatique ajoutée (100µL) contient 2 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'*An* recombinante (caractérisée comme ayant une pureté de l'ordre de 25%) dans 2,470 mL d'eau distillée.
- 20 Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'éenantiosélectivité E apparent de 5.

Analyses réalisées sur une colonne type Lipodex E ($T=100^{\circ}\text{C}$; $tr=3,8$ min et 4,8 min pour les deux énantiomères de l'époxyde ; $tr= 4,3$ pour l'étalon interne)

25

Exemple 3

La procédure décrite dans l'exemple 1 est appliquée au 3-(trifluorométhyl-phényl)-oxirane (5,0 mg soit [3-(trifluorométhyl-phényl)-oxirane] =2,66 mM), en présence de 20 % de DMSO. La solution enzymatique ajoutée (100µL) contient 2 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'*An* recombinante (caractérisée comme ayant une pureté de l'ordre de 25%) dans 2.680 mL d'eau distillée.

Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'éenantiosélectivité de 10.

Analyses réalisées sur une colonne type Chirasil-Dex CB ($T=90^{\circ}\text{C}$; $tr=13,2$ min et 13,7 min pour les deux énantiomères de l'époxyde ; $tr=10,4$ min pour l'étalon interne)

Exemple 4

La procédure décrite dans l'exemple 1 est appliquée au 4-(trifluorométhyl-phényle)-oxirane (4,7 mg soit [4-(trifluorométhyl-phényle)-oxirane] =2,5 mM), en présence de 20 % de DMSO. La solution enzymatique ajoutée (100µL) contient 2 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'*An* recombinante (caractérisée comme ayant une pureté de l'ordre de 25%) dans 2.470 mL d'eau distillée.

Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'énantiosélectivité E apparent de 50.

Analyses réalisées sur une colonne type Chirasil-Dex CB (T=120°C ; tr=9,7 min et 10,7 min pour les deux énantiomères de l'époxyde ; tr=3,9 min pour l'étalon interne)

Exemple 5

La procédure décrite dans l'exemple 1 est appliquée au 3,5-(bistrifluorométhyl-phényle)-oxirane (0,77 mg soit [3,5-(bistrifluorométhyl-phényle)-oxirane] =0,3 mM), en présence de 25 % de DMSO. La solution enzymatique ajoutée (100µL) contient 2 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'*An* recombinante (caractérisée comme ayant une pureté de l'ordre de 25%) dans 15.065 mL d'eau distillée.

Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'énantiosélectivité E apparent de 4.

Analyses réalisées sur une colonne type Chirasil-Dex CB (T=80°C ; tr=9,8 min et 10,1 min pour les deux énantiomères de l'époxyde ; tr=17,1 min pour l'étalon interne)

Exemple 6

La procédure décrite dans l'exemple 1 est appliquée au méthyl-(3-trifluorométhyl-phényle)-oxirane (5,0 mg soit [méthyl-(3-trifluorométhyl-phényle)-oxirane] =2,5 mM), en présence de 30 % de DMSO. La solution enzymatique ajoutée (100µL) contient 2 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'*An* recombinante (caractérisée comme ayant une pureté de l'ordre de 25%) dans 2.320 mL d'eau distillée.

Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'énantiosélectivité de 25.

Analyses réalisées sur une colonne type Chirasil-Dex CB (T=100°C ; tr=8,5 min et 9,1 min pour les deux énantiomères de l'époxyde ; tr=6,9 min pour l'étalon interne)

Exemple 7

La procédure décrite dans l'exemple 1 est appliquée au méthyl-(4-trifluorométhyl-phényle)-oxirane (3,6 mg soit [méthyl-(4-trifluorométhyl-phényle)-oxirane] =1,8 mM), en présence de 30

% de DMSO. La solution enzymatique ajoutée (100 μ L) contient 2 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'An recombinante (caractérisée comme ayant une pureté de l'ordre de 25%) dans 3.222 mL d'eau distillée.

Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'enantiosélectivité E apparent de 30.

5

Analyses réalisées sur une colonne type Chirasil-Dex CB ($T=120^{\circ}\text{C}$; $tr=6,4$ min et 7,1 min pour les deux énantiomères de l'époxyde ; $tr=3,9$ min pour l'étalon interne)

Exemple 8

- 10 La procédure décrite dans l'exemple 1 est appliquée au 4-(trifluorométhylthio-phényle)-oxirane (4,4 mg soit [4-(trifluorométhylthio-phényle)-oxirane] = 2 mM), en présence de 30 % de DMSO. La solution enzymatique ajoutée (100 μ L) contient 2 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'An recombinante (caractérisée comme ayant une pureté de l'ordre de 25%) dans 5.273 mL d'eau distillée.
- 15 Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'enantiosélectivité E apparent de 160.

Analyses réalisées sur une colonne type Chirasil-Dex CB ($T=130^{\circ}\text{C}$; $tr=7,2$ min et 7,6 min pour les deux énantiomères de l'époxyde ; $tr=2,8$ min pour l'étalon interne)

- 20 **Résolution cinétique par l'EH d'An – Système biphasique – échelle analytique**
Exemple 9

Résolution cinétique du 4-(trifluorométhoxy-phényle)-oxirane par l'EH d'An – Système biphasique ; échelle analytique

- 25 Dans un tube haut et étroit à fond plat (diamètre 15 mm), 100 mg de 4-(trifluorométhoxy-phényle)-oxirane sont placés dans 100 μ L d'iso-octane. On ajoute 20 μ L de 3-(trifluorométhyl)-acétophénone (étalon interne) et 850 μ L d'eau distillée. Le flacon est bouché, muni d'une violente agitation magnétique (formation d'une émulsion) et placé à 27°C. Avant l'ajout de 0,86 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'An recombinante (pureté 25 %) en solution dans 50 μ L d'eau distillée, l'agitation est stoppée, 1 μ L de la phase organique est prélevé et l'agitation est relancée. Le prélèvement est dilué par de l'acétate d'éthyle et injecté en CPG chirale. Ce type de prélèvement, répété au cours du temps, permet de suivre l'évolution de l'excès énantiomérique du substrat résiduel et du taux de conversion de l'époxyde. Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'enantiosélectivité E apparent de 160.
- 30
- 35

Analyses réalisés sur une colonne type Chirasil-Dex CB (T=120°C ; tr=4,4 min et 4,8 min pour les deux énantiomères de l'époxyde ; tr=3,9 min pour l'étalon interne)

Exemple 10

- 5 La procédure décrite dans l'exemple 9 est appliquée au 2-(trifluorométhyl-phényl)-oxirane. Dans ce cas, pour 100 mg de substrat sont ajoutés 1,7 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'An recombinante (pureté 25 %). Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'enantiosélectivité E apparent de 20.

10 ***Exemple 11***

La procédure décrite dans l'exemple 9 est appliquée au 3-(trifluorométhyl-phényl)-oxirane. Dans ce cas, pour 100 mg de substrat sont ajoutés 1,7 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'An recombinante (pureté 25 %).

Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'enantiosélectivité E apparent de 10.

15

Exemple 12

La procédure décrite dans l'exemple 9 est appliquée au 4-(trifluorométhyl-phényl)-oxirane. Dans ce cas, pour 100 mg de substrat sont ajoutés 1,7 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'An recombinante (pureté 25 %).

- 20 Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'enantiosélectivité E apparent de 270.

Exemple 13

- La procédure décrite dans l'exemple 9 est appliquée au (3,5-bistrifluorométhyl-phényl)-oxirane. Dans ce cas, pour 100 mg de substrat sont ajoutés 1,7 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'An recombinante (pureté 25 %).

Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'enantiosélectivité E apparent de 17.

Exemple 14

- La procédure décrite dans l'exemple 9 est appliquée au méthyl-(3-trifluorométhyl-phényl)-oxirane. Dans ce cas, pour 100 mg de substrat sont ajoutés 1,7 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'An recombinante (pureté 25 %).

Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'enantiosélectivité E apparent de 25.

Exemple 15

- 35 La procédure décrite dans l'exemple 9 est appliquée au méthyl-(4-trifluorométhyl-phényl)-oxirane. Dans ce cas, pour 100 mg de substrat sont ajoutés 1,7 mg d'extrait enzymatique de l'EH d'An recombinante (pureté 25 %).

Les valeurs obtenues correspondent à un coefficient d'énanriosélectivité E apparent de 50.

Résolution cinétique par méthode chimique (comparatif)

5 ***Exemple 16***

Résolution cinétique de 4-(trifluorométhoxy-phényl)-oxirane par méthode chimique

Dans un mini-réacteur de 1 mL muni d'une agitation magnétique, 204 mg (1 mmole) de 4-

(trifluorométhoxy-phényl)-oxirane sont ajoutés à 4,76 mg (0.007 mmole) de

10 (R,R)(Salen)Co(OAc). On introduit en une seule fois 9,9 μ L d'eau (0.55 mmol) à température ambiante. Le système est placé pendant 48h sous agitation à température ambiante. On

extrait ensuite la totalité du milieu réactionnel par 10 mL d'iso-octane. 1 mL de la phase organique est alors prélevé. On lui ajoute 1 mL de solution d'iso-octane contenant de l'étalon

3-(trifluorométhyl)-acétophénone à 5 g.L⁻¹. 0.2 μ L de ce mélange est injecté en GC chirale.

15 Les valeurs obtenues ($ee_{époxyde résiduel}=98,6\%$; $ee_{diol formé}=89,0\%$) correspondent à un coefficient d'énanriosélectivité E apparent de 84.

Exemple 17

La procédure décrite dans l'exemple 16 est appliquée au (2-trifluorométhyl-phényl)-oxirane à

20 l'échelle de la millimole.

Les valeurs obtenues ($ee_{époxyde résiduel}=23,3\%$; $c=77,7\%$) correspondent à un coefficient d'énanriosélectivité E apparent de 1.4.

Exemple 18

25 La procédure décrite dans l'exemple 16 est appliquée au (3-trifluorométhyl-phényl)-oxirane à l'échelle de la millimole.

Les valeurs obtenues ($ee_{époxyde résiduel}=100\%$; $c=61\%$) correspondent à un coefficient d'énanriosélectivité E apparent supérieur ou égal à 33.

30 ***Exemple 19***

La procédure décrite dans l'exemple 16 est appliquée au (4-trifluorométhyl-phényl)-oxirane à l'échelle de la millimole.

Les valeurs obtenues ($ee_{époxyde résiduel}=97,8\%$; $ee_{diol formé}=79,3\%$) correspondent à un coefficient d'énanriosélectivité E apparent de 38.

Exemple 20

La procédure décrite dans l'exemple 16 est appliquée au méthyl-(3-trifluorométhyl-phényl)-oxirane à l'échelle de la millimole.

- Les valeurs obtenues ($ee_{époxyde résiduel} = 0,1\% ; c = 2,0\%$) correspondent à un coefficient d'énantiosélectivité E apparent de 1.

Exemple 21

La procédure décrite dans l'exemple 16 est appliquée au méthyl-(4-trifluorométhyl-phényl)-oxirane à l'échelle de la millimole.

- Les valeurs obtenues ($ee_{époxyde résiduel} = 0,2\% ; c = 19,4\%$) correspondent à un coefficient d'éenantiosélectivité E apparent proche de 1.

Exemple 22

La procédure décrite dans l'exemple 16 est appliquée au 4-(trifluorométhylthio-phényl)-oxirane à l'échelle de la millimole.

Les valeurs obtenues ($ee_{époxyde résiduel} = 99,6\% ; ee_{diol formé} = 89,4\%$), correspondent à un coefficient d'éenantiosélectivité E apparent de 110.

Résolution cinétique par l'EH d'An – Système biphasique –**Echelle préparative*****Exemple 23***

Résolution cinétique de 4-(trifluorométhoxy-phényl)-oxirane par l'EH d'An – Système biphasique ; échelle préparative.

Dans un flacon muni d'une agitation mécanique, on place 1,25 g de 4-(trifluorométhoxy-phényl)-oxirane racémique (soit 6,13 mmoles) dans 2,5 mL d'iso-octane. On ajoute 21,5 mL d'eau distillée. L'ensemble est placé sous agitation dans un bain thermostaté à 27°C. Pendant ce temps, on prépare une solution enzymatique contenant 12,5 mg par mL d'eau d'extrait enzymatique EH d'An recombinante (pureté 25%). Cette solution est elle aussi placée à 27°C. Après 30 minutes, on ajoute au milieu réactionnel 1 mL de la solution enzymatique précédemment préparée. Ce moment correspond au temps t_0 .

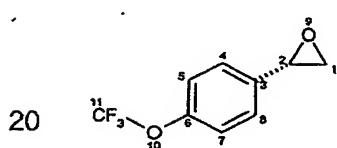
La réaction est suivie par GC chirale. On prélève régulièrement 1 µL au milieu réactionnel que l'on ajoute à 40 µL d'acétate d'éthyle placés au préalable dans un eppendorf. Après agitation au vortex et centrifugation, on injecte en GC chirale pour mesurer l'excès énantiomérique de l'époxyde résiduel. Lorsqu'il atteint une valeur suffisante (excès

énanthiomérique > 97 %), on stoppe la réaction par ajout de 30 mL d'acétate d'éthyle. On laisse décanter, récupère la phase organique et extrait par 2x50 mL d'acétate d'éthyle la phase aqueuse. Les phases organiques sont réunies, lavées par 30 mL de solution aqueuse saturée en NaCl, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. L'époxyde résiduel et le diol formé sont séparés par chromatographie flash sur gel de silice (50 parties ; éluant : hexane / acétate d'éthyle 90/10 jusqu'à acétate d'éthyle pur). En vue de la mesure des pouvoirs rotatoires, chaque produit isolé subit ensuite une purification au four à boules pour éliminer toute trace de solvant et de silice. On obtient 615 mg de (*R*)-(4-trifluoromethoxy-phenyl)-ethane-1,2-diol (rdt= 45,6% ; ee= 94,5%) et 543 mg de (*S*)-4-(trifluorométhoxy-phényl)-oxirane (rdt= 43,4% ; ee = 98,6%).

Analyse structurale

(S)-4-(trifluorométhoxy-phényl)-oxirane

15 RMN ¹H / CDCl₃ : δ 2,79 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2,5 Hz, ¹J_{HH} = 5,3 Hz, H₁), δ 3,19 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4,0 Hz, ¹J_{HH} = 5,3 Hz, H₁), δ 3,92 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2,5 Hz, ³J_{HH} = 4,0 Hz, H₂), δ 7,38–7,65 (m, 4H, H_{4,6,7,8}).

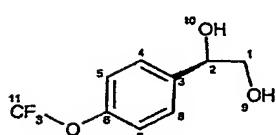


20 RMN ¹³C / CDCl₃ : δ 51,3 (C₁), δ 51,7 (C₂), δ 120,4 (q, ¹J_{CF}=265,5 Hz, C₁₁), δ 121,1 (C₄ et C₈), δ 126,9 (C₅ et C₇), δ 136,4 (C₃), δ 149,1 (q, J=1,9 Hz, C₆).

$$[\alpha]_D^{22} = +13.7 \text{ (c=1,58 ; CHCl}_3\text{)}$$

25 (R)-(4-trifluoromethoxy-phenyl)-ethane-1,2-diol

30 RMN ¹H / CDCl₃ : δ 2,13 (s, 1H, H₁₀ ou H₉), δ 2,69 (s, 1H, H₁₀ ou H₉), δ 3,70 (m, 2H, H_{1,1'}), δ 4,84 (m, 1H, H₂), δ 7,21 (d, 2H, ³J_{HH} = 8,75 Hz, H_{4,8}), δ 7,41 (d, 2H, ³J_{HH} = 8,5 Hz, H_{5,7}).



$$[\alpha]_D^{22} = -41,5 \text{ (c=1,04 ; CHCl}_3\text{)}$$

Exemple 24

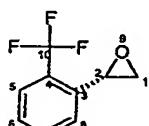
35 La procédure décrite dans l'exemple 23 est appliquée au 2-(trifluorométhyl-phényle)-oxirane. On obtient le (*S*)-2-(trifluorométhyl-phényle)-oxirane (rdt=34,5% ; ee=97,9%) et le (*R*)-2-trifluoromethyl-phenyl)-ethane-1,2-diol (rdt=59,2% ; ee=77,3%).

Analyse structurale

(S)-2-(trifluorométhyl-phényle)-oxirane

40

RMN ¹H / DMSO-d₆ : δ 2,75 (dd, 1H, ¹J_{HH} = 5,5 Hz, ³J_{HH} = 2,5 Hz, H₁), δ 3,21 (dd, 1H, ¹J_{HH} = 5,5 Hz, ³J_{HH} = 4,25 Hz H₁), δ 4,15 (m,



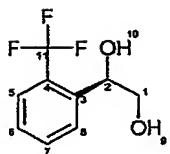
1H, H₂), δ 7,44 (d, 1H, ³J_{HH} = 7,75 Hz, H₈), δ 7,54 (t, ³J_{HH} = 7,5 Hz, H₇), δ 7,63 (t, 1H, ³J_{HH} = 7,5 Hz, H₆), δ 7,75 (d, 1H, ³J_{HH} = 7,75 Hz, H₅).

5 RMN ¹³C / DMSO-d₆ : δ 48,5 (q, ⁴J_{CF}=2,7 Hz, C₂), δ 50,2 (C₁), δ 124,3 (q, ¹J_{CF}=273,5, C₁₀), δ 125,5 (q, ³J_{CF}=5,4 Hz, C₅), δ 125,55 (C₆ et C₈), δ 126,9 (q, ²J_{CF}=30,7 Hz, C₄), δ 128,2 (C₇), δ 136,2 (m, C₃).

10 [α]_D²² = +62,4 (c=0,89 ; CHCl₃)

(R)-2-(trifluoromethyl-phenyl)-ethane-1,2-diol

15 RMN ¹H / CDCl₃ : δ 2,45 (s, 1H, H₉ ou H₁₀), δ 3,00 (s, 1H, H₉ ou H₁₀), δ 3,67 (massif, 2H, H_{1,1'}), δ 5,23 (massif, 1H, H₂) δ 7,44-7,65 (m, 4H, H_{4,6,7,8}).



20 RMN ¹³C / CDCl₃ : δ 67,8 (C₁), δ 74,4 (C₂), δ 125,6 (q, ³J_{CF}=5,8 Hz, C₅), δ 124,2 (q, ¹J_{CF}=273,7 Hz, C₁₁), δ 127,3 (q, ²J_{CF}=30,3 Hz, C₄), δ 128,0 (C₆ ou C₈), δ 128,2 (C₆ ou C₈), δ 132,2 (C₇), δ 139,2 (C₃).

25 [α]_D²² = -47,9 (c=0,98 ; CHCl₃)

Exemple 25

La procédure décrite dans l'exemple 23 est appliquée au 3-(trifluorométhyl-phényle)-oxirane.

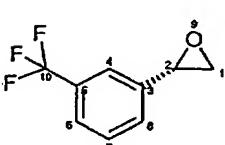
On obtient le (S)-3-(trifluorométhyl-phényle)-oxirane (rdt=11,4% ; ee=98,7%) et le (R)-3-

30 (trifluorométhyl-phényle)-ethane-1,2-diol (rdt=84,9% ; ee=13,2%).

Analyse structurale

(S)-3-(trifluorométhyl-phényle)-oxirane

35 RMN ¹H / CDCl₃ : δ 2,79 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2,5 Hz, ¹J_{HH} = 5,3 Hz, H₁), δ 3,19 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4,0 Hz, ¹J_{HH} = 5,3 Hz, H₁), δ 3,92 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2,5 Hz, ³J_{HH} = 4,0 Hz, H₂), δ 7,38-7,65 (m, 4H, H_{4,6,7,8}).

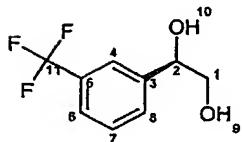


40 RMN ¹³C / CDCl₃ : δ 51,4 (C₁), δ 51,7 (C₂), δ 122,3 (q, ³J_{CF}=3,8 Hz, C₄), δ 124,0 (q, ¹J_{CF}=272,0 Hz, C₁₀), δ 125,0 (q, ³J_{CF}=3,7 Hz, C₆), δ 129,0 (C₇ ou C₈), δ 129,8 (C₇ ou C₈), δ 131,0 (q, ²J_{CF}=32,4 Hz, C₅), δ 138,8 (C₃).

45 RMN ¹⁹F / CDCl₃ : δ 12,9

$[\alpha]_D^{22} = +9,1$ ($c=0,92$; CHCl_3). configuration (S) d'après Ferris, M. J., Arylethanolamine derivatives and their use in pharmaceutical compositions, EP 40,000, 1981.

5 (R)-3-(trifluoromethyl-phenyl)-ethane-1,2-diol



10 RMN ^1H / CDCl_3 : δ 2,16 (s, 1H, H_9 ou H_{10}), δ 2,33 (s, 1H, H_9 ou H_{10}), δ 3,71 (ddd, 2H, $^1\text{J}_{\text{HH}} = 11$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HF}} = 3,25$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 8,25$ Hz, $\text{H}_{1,1'}$), δ 7,44-7,65 (m, 4H, $\text{H}_{4,6,7,8}$).

15 RMN ^{13}C / CDCl_3 : δ 67,9 (C_1), δ 74,0 (C_2), δ 122,8 (q, $^3\text{J}_{\text{CF}} = 3,8$ Hz, C_4), δ 124,8 (q, $^3\text{J}_{\text{CF}} = 3,7$ Hz, C_6), δ 124,0 (q, $^1\text{J}_{\text{CF}} = 272,4$ Hz, C_{11}), δ 129,0 (C_7 ou C_8), δ 129,4 (C_7 ou C_8), δ 130,9 (q, $^2\text{J}_{\text{CF}} = 32,3$ Hz, C_5), δ 139,4 (C_3).

20 $[\alpha]_D^{22} = -5,7$ ($c=0,98$; CHCl_3)

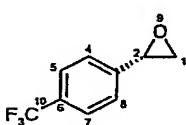
Exemple 26

La procédure décrite dans l'exemple 23 est appliquée au 4-(trifluorométhyl-phényle)-oxirane.

25 On obtient le (S)-4-(trifluorométhyl-phényle)-oxirane (rdt=37,4% ; ee=97,9%) et le (R)-4-(trifluorométhyl-phényle)-ethane-1,2-diol (rdt=51,3% ; ee=84,3%).

Analyse structurale

(S)-4-(trifluorométhyl-phényle)-oxirane

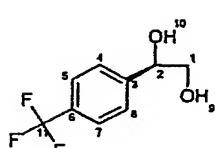


30 RMN ^1H / CDCl_3 : δ 2,77 (dd, 1H, $^1\text{J}_{\text{HH}} = 5,75$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 2,75$ Hz, H_1), δ 3,18 (dd, 1H, $^1\text{J}_{\text{HH}} = 5,75$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 4,0$ Hz H_1), δ 3,91 (dd, 1H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 4$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 2,75$ Hz, H_2), δ 7,39 (d, 1H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 8$ Hz, H_4 , H_6), δ 7,60 (d, 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 8$ Hz, H_5 , H_7).

35 RMN ^{13}C / CDCl_3 : δ 51,4 (C_1), δ 51,7 (C_2), δ 124,0 (q, $^1\text{J}_{\text{CF}} = 271,8$ Hz, C_{10}), δ 125,5 (q, $^3\text{J}_{\text{CF}} = 4,0$ Hz, C_5 et C_7), δ 125,7 (C_4 et C_8), δ 130,4 (q, $^2\text{J}_{\text{CF}} = 32,2$ Hz, C_6), δ 141 (s, C_3).

40 $[\alpha]_D^{22} = +18,0$ ($c=1,13$; CHCl_3)

(R)-4-(trifluoromethyl-phenyl)-ethane-1,2-diol



45 RMN ^1H / CDCl_3 : δ 2,07 (s, 1H, H_{10} ou H_9), δ 2,70 (s, 1H, H_{10} ou H_9), δ 3,88 (m, 2H, $\text{H}_{1,1'}$), δ 4,89 (m, 1H, H_2), δ 7,50 (d, 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, $\text{H}_{4,8}$), δ 7,63 (d, 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, $\text{H}_{5,7}$).

45 $[\alpha]_D^{22} = -39,3$ ($c=1,03$; CHCl_3) configuration (R) d'après Shimada, T.; Mukaide, K.; Shinohara, A.; Han, J. W.; Hayashi, T.,

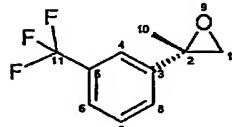
Asymmetric synthesis of 1-Aryl-1,2-ethanediols from Arylcetylenes
by Palladium-Catalysed asymmetric hydrosilylation as a key step,
J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 1584-1585.

5 ***Exemple 27***

La procédure décrite dans l'exemple 23 est appliquée au méthyl-(3-trifluorométhyl-phényle)-oxirane. On obtient le (*S*)-méthyl-(3-trifluorométhyl-phényle)-oxirane (rdt=32,7% ; ee=98,3%) et le (*R*)-méthyl-(3-trifluorométhyl-phényle)-ethane-1,2-diol (rdt=64,1% ; ee=59,0%).

10 ***Analyse structurale***

(*S*)-méthyl-(3-trifluorométhyl-phényle)-oxirane



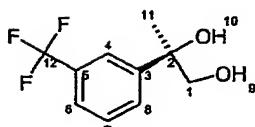
15 **RMN ^1H / CDCl_3** : δ 1,55 (s, 3H, H_{10}), δ 2,75 (d, 1H, $^1\text{J}_{\text{HH}} = 5,4$ Hz, H_1), δ 2,98 (d, 1H, $^1\text{J}_{\text{HH}} = 5,4$ Hz, H_1), δ 7,40–7,59 (m, 4H, $\text{H}_{4,6,7,8}$).

20 **RMN ^{13}C / CDCl_3** : δ 21,5 (C_{10}), δ 56,2 (C_1), δ 57,0 (C_2), δ 122,2 (q, $^3\text{J}_{\text{CF}}=3,8$ Hz, C_4 ou C_6), δ 124,1 (q, $^1\text{J}_{\text{CF}}=272,5$ Hz, C_{11}), δ 124,3 (q, $^1\text{J}_{\text{CF}}=3,8$ Hz, C_4 ou C_6), δ 128,7 (C_7), δ 128,9 (C_8), δ 130,8 (q, $^2\text{J}_{\text{CF}}=32,1$ Hz, C_5), δ 142,4 (C_3).

25 **RMN ^{19}F / CDCl_3** : δ 13,0

$[\alpha]_D^{22}=+8,3$ ($c=1,00$; CHCl_3)

30 (*R*)-méthyl-(3-trifluorométhyl-phényle)-ethane-1,2-diol



35 **RMN ^1H / CDCl_3** : δ 1,52 (s, 3H, H_{11}), δ 2,37 (s, 1H, H_9 ou H_{10}), δ 2,99 (s, 1H, H_9 ou H_{10}), δ 3,69 (m, 2H, $\text{H}_{1,1'$ }), δ 7,43–7,73 (m, 4H, $\text{H}_{4,6,7,8}$).

40 **RMN ^{13}C / CDCl_3** : δ 26,0 (C_{11}), δ 70,7 (C_1), δ 74,7 (C_2), δ 122,1 (q, $^3\text{J}_{\text{CF}}=3,8$ Hz, C_4), δ 124,0 (q, $^1\text{J}_{\text{CF}}=3,8$ Hz, C_6), δ 124,2 (q, $^1\text{J}_{\text{CF}}=272,4$ Hz, C_{12}), δ 128,6 (C_7 ou C_8), δ 128,8 (C_7 ou C_8), δ 130,7 (q, $^2\text{J}_{\text{CF}}=32,1$ Hz, C_5), δ 142,4 (C_3).

$[\alpha]_D^{22}=-5,9$ ($c=1,25$; CHCl_3)

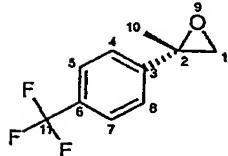
45 ***Exemple 28***

La procédure décrite dans l'exemple 23 est appliquée au méthyl-(4-trifluorométhyl-phényle)-oxirane. On obtient le (*S*)-méthyl-(4-trifluorométhyl-phényle)-oxirane (rdt=35,0% ; ee=99,1%) et le (*R*)-méthyl-(4-trifluorométhyl-phényle)-ethane-1,2-diol (rdt=58,0% ; ee=88,3%).

50 ***Analyse structurale***

(S)-méthyl-(4-trifluorométhyl-phényl)-oxirane

RMN ^1H / CDCl_3 : δ 1,73 (s, 3H, H_{10}), δ 2,76 (d, 1H, $^1\text{J}_{\text{HH}} = 5,4$ Hz, H_1), δ 3,00 (d, 1H, $^1\text{J}_{\text{HH}} = 5,4$ Hz, H_1), δ 7,48 (d, 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, $\text{H}_{4,8}$), δ 7,59 (d, 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, $\text{H}_{5,7}$).

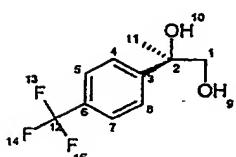


RMN ^{13}C / CDCl_3 : δ 22,2 (C_{10}), δ 57,1 (C_1), δ 57,8 (C_2), δ 124,9 (q, $^1\text{J}_{\text{CF}}=270,3$ Hz, C_{11}), δ 126,1 (q, $^3\text{J}_{\text{CF}}=3,8$ Hz, C_5 et C_7), δ 126,5 (C_4 et C_8), δ 130,5 (q, $^2\text{J}_{\text{CF}}=31,9$ Hz, C_6), δ 146,1 (C_3).

$$[\alpha]_D^{22} = +16.7 \text{ (c=0.89 : CHCl}_3\text{)}$$

(*R*)-méthyl-(4-trifluorométhyl-phényl)-ethane-1,2-diol

15



RMN ^1H / CDCl_3 : δ 1,55 (s, 3H, H_{11}), δ 1,84 (dd, 1H, $^3\text{J}_{\text{H}9\text{H}1} = 5$ Hz,
 $^3\text{J}_{\text{H}9\text{H}1'} = 7,25$ Hz, H_9), δ 2,68 (s, 1H, H_{10}), δ 3,74 (ddd, 2H, $^1\text{J}_{\text{H}1\text{H}1'} = 11$ Hz,
 $^3\text{J}_{\text{H}9\text{H}1} = 5$ Hz, $^3\text{J}_{\text{H}9\text{H}1'} = 7,25$ Hz, $\text{H}_{1,1'}$), δ 7,58 (d, 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 8,75$ Hz,
 $\text{H}_{4,8}$), δ 7,63 (d, 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 8,75$ Hz, $\text{H}_{6,7}$).

$$[\alpha]_D^{22} = -9,4 \text{ (c=1,03 ; CHCl}_3\text{)}$$

Exemple 29

Dans un flacon muni d'une agitation mécanique, on place 645 mg de 4-(trifluorométhylthiophényl)-oxirane racémique (soit 2,93 mmoles) dans 6,45 mL d'iso-octane. On ajoute 57,05 mL d'eau distillée. L'ensemble est placé sous agitation dans un bain thermostaté à 0°C.

30 Pendant ce temps, on prépare une solution enzymatique contenant 12,9 mg par mL d'eau d'extrait enzymatique EH d'*An* recombinante (pureté 25 %). Cette solution est elle aussi placée à 27°C. Après 30 minutes, on ajoute au milieu réactionnel 1 mL de la solution enzymatique précédemment préparée. Ce moment correspond au temps t_0 .

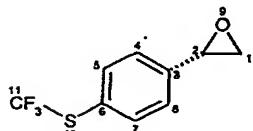
Le suivi et le traitement de la réaction retenus sont ceux présentés dans l'exemple 22.

35 On obtient le (S)-4-(trifluorométhylthio-phényl)-oxirane (rdt=37,2% ; ee=98,0%) et le (R)-4-(trifluorométhylthio-phényl)-ethane-1,2-diol (rdt=38,9% ; ee=85,0%).

Analyse structurale

(S)-4-(trifluorométhylthio-phényl)-oxirane

40



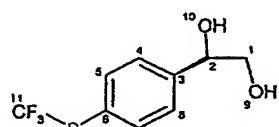
RMN ^1H / CDCl₃: δ 2,78 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2,5$ Hz, $^1J_{\text{HH}} = 5,5$ Hz, H₁), δ 3,18 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4,0$ Hz, $^1J_{\text{HH}} = 5,5$ Hz, H₁), δ 3,89 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2,5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4,0$ Hz, H₂), δ 7,37 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8,2$ Hz, H_{4,8}), δ 7,64 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8,2$ Hz, H_{5,7}).

RMN ^{13}C / DMSO-d₆ : δ 66,9 (C₁), δ 73,1 (C₂), δ 124,0 (q, J=1,9 Hz, C₆), δ 127,9 (C₄ et C₈), δ 129,6 (q, $^1\text{J}_{\text{CF}}=307.6$ Hz, C₁₁), δ 135,7 (C₅ et C₇), δ 147,4 (C₃).

5 [α]_D²²= +21,1 (c=1,20 ; CHCl₃)

(R)-4-(trifluorométhylthio-phényl)-ethane-1,2-diol

10 RMN ^1H / DMSO-d₆ : δ 3,46 (m, 2H, H_{1,1'}), δ 4,61 (dd, 1H, J = 4,25 Hz, J= 5,75 Hz, H₂), δ 4,83 (dd, 1H, J = 5,75 Hz, H₉), δ 5,47 (d, 1H, J = 4,25 Hz, H₁₀), δ 7,51 (d, 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}}=8$ Hz, H_{4,8}), δ 7,67 (d, 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}}=8$ Hz, H_{5,7}).



15 RMN ^{13}C / DMSO-d₆ : δ 67,9 (C₁), δ 73,1 (C₂), δ 74,7 (C₂), δ 120,8 (C₆), δ 130,0 (q, $^1\text{J}_{\text{CF}}=318.4$ Hz, C₁₁), δ 127,9 (C₄ et C₈), δ 135,8 (C₅ et C₇), δ 147,4 (C₃).

20 [α]_D²²= -5,0 (c=1,18 ; CHCl₃)

Détermination des configurations absolues

Diols non décrits dans la littérature

Nous avons appliqué une méthode utilisant le dichroïsme circulaire décrite sur des substrats
25 du même type, par Bar, L. D.; Pescitelli, G.; Pratelli, C.; Pini, D.; Salvadori, P.,
Determination of absolute configuration of acyclic 1,2-diols with Mo₂(OAc)₄. Snatzke's
method revisited, *J. Org. Chem.*, 2001, 66, 4819-4825.

Protocole expérimental :

30 A une solution d'environ 0,6 à 0,7 mg.mL⁻¹ de Mo₂(AcO)₄ commercial dans le DMSO,
une quantité de diol est ajoutée de telle sorte que le ratio ligand/métal soit compris entre
0,6 :1,2 (pour les substrats de faible pureté optique). Le premier ICD (Induced Circular
Dichroism) est mesuré immédiatement après le mélange et un contrôle est effectué toutes
les dix minutes jusqu'à stabilisation (40-50 min).

35

40

Résultats

Diol de l'exemple	ee	concentration (mM)	Ratio diol/Mo ₂ (AcO) ₄	Bandes ICD : $\lambda_{\text{ext}} (\text{nm})$, $\Delta\epsilon$			
				V	IV	III	II
24	77	0.375	1	280 (0.12)	305 (-0.66)	348 (0.06)	385 (-0.18)
25	13.2	0.75	1	279 (0.04)	301 (-0.14)	352 (-0.01)	375 (-0.05)
27	59	0.75	1	277 (0.15)	316 (-0.22)	342 (-0.01)	385 (-0.05)
26	84.3	0.375	1	270 (0.07)	308 (-0.60)	350 (-0.12)	381 (-0.20)
28	88.3	0.375	1	273 (0.15)	308 (-0.18)	350 (0.02)	379 (-0.06)
29	nd	1.5	1	nd	nd	nd	nd
23	94.5	0.375	1	272 (0.26)	310 (-1.22)	352 (-0.22)	375 (-0.33)

Dichroïsme circulaire ; conditions & résultats expérimentaux ($\Delta\epsilon$ normalisé par rapport à la concentration en diol)

- 5 Selon les règles décrites par Snatzke, tous les diols testés sont de configuration absolue (R).

Epoxydes non décrits dans la littérature

- 10 On obtient la configuration absolue des époxydes par corrélation chimique. Les diols sont cyclisés en époxyde avec rétention de configuration (méthode décrite ci-dessous dans l'exemple 30). L'injection en GC chirale permet par comparaison du chromatogramme obtenu avec l'époxyde issu de la réaction enzymatique de déduire la configuration absolue de l'époxyde.

15

Exemple 30Cyclisation du (R)-méthyl-(3-trifluorométhyl-phényl)-ethane-1,2-diol

- 20 Dans un mini-réacteur conique de 3 mL muni d'une agitation magnétique, on place 11,0 mg (1 mmole) de (R)-méthyl-(3-trifluorométhyl-phényl)-ethane-1,2-diol (ee=88,3%) et 500 µL de THF. On ajoute un équivalent de chlorure de tosyle en solution dans 500 µL de

THF. Après une heure d'agitation à température ambiante, on ajoute 6 équivalents d'hydrure de sodium. Après 12h d'agitation, on ajoute 100 µL d'eau et extrait par 1 mL d'éther éthylique. On injecte la phase organique en GC chirale.

5 Cette technique a permis de montrer que tous les époxydes résiduels décrits dans les exemples 23 à 29 étaient de configuration absolue (S).

Il doit être bien compris que l'invention définie par les revendications annexées n'est
10 pas limitée aux modes de réalisation particuliers indiqués dans la description ci-dessus, mais
en englobe les variantes qui ne sortent ni du cadre ni de l'esprit de la présente invention.

Revendications

1- Procédé d'hydrolyse d'un époxyde fluoré comportant un ou plusieurs groupes CF₃, procédé dans lequel on traite l'époxyde en présence d'eau avec une protéine ayant une activité époxyde hydrolase (EH) sur les époxydes à CF₃ de manière à induire l'ouverture de l'époxyde et la formation du diol vicinal.

2- Procédé selon la revendication 1, dans lequel la protéine ayant une activité époxyde hydrolase (EH) sur les époxydes à CF₃ comporte la séquence en acides aminés suivante :

- i. la séquence en acides aminés SEQ ID NO : 2 ; ou
- ii. une séquence ayant un pourcentage d'homologie égal ou supérieur à 40 %, de préférence à 80 %, de manière plus préférée à 85 %, de manière encore plus préférée à 90 %, et mieux encore à 95, 96, 97, 98 ou 99 % avec la SEQ ID NO : 2, la protéine ainsi définie ayant une activité EH sur les époxydes à CF₃;
- iii. une séquence comprenant au moins 10, de préférence au moins 20, de manière plus préférée au moins 50 ou 100 acides aminés consécutifs de la SEQ ID NO : 2 ou d'une séquence telle que définie sous ii, la protéine ainsi définie ayant une activité EH sur les époxydes à CF₃.

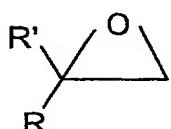
3- Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la protéine est codée par un acide nucléique comprenant la séquence suivante :

- (a) la séquence nucléotidique représentée à la SEQ ID NO : 1;
- (b) une séquence nucléotidique qui code pour la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 ;
- (c) une séquence nucléotidique qui diffère de la séquence selon (a) ou (b) par dégénérescence du code;
- (d) une séquence nucléotidique s'hybridant à une séquence selon (a), (b) ou (c), et codant pour une protéine ayant une activité EH sur les époxydes à CF₃;
- (e) une séquence nucléotidique ayant un pourcentage d'identité égal ou supérieur à 45 %, de préférence à 80 %, de manière plus préférée à 85 %, de manière encore plus préférée à 90 %, et mieux encore à 95, 96, 97, 98 ou 99 % avec la SEQ ID NO : 1, et codant pour une protéine ayant une activité EH sur les époxydes à CF₃;
- (f) un fragment d'une séquence nucléotidique selon (a), (b), (c), (d) ou (e), comprenant au moins 30, de préférence au moins 60, de manière plus préférée

au moins 150 ou 300 nucléotides consécutifs, et codant pour une protéine ayant une activité EH sur les époxydes à CF₃.

4- Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel la protéine est
5 l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger* LCP521, naturelle ou recombinante.

5- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'époxyde répond à la formule (I) :



10

dans laquelle :

- le groupe R représente un groupe alkyle, alcényle, cycloalkyle, aryle ou aralkyle, éventuellement substitué par alkyle, alcoxy, alkylthio ou halogène; les substituants alkyle, alcoxy, alkylthio comportant une chaîne hydrocarbonée en C₁-C₆, de préférence en C₁-C₃, linéaire, ramifié ou cyclique et comportant éventuellement un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F ;
- le groupe R' représente H ou un alkyle linéaire, ramifié ou cyclique en C₁-C₁₀, de préférence en C₁, C₂ ou C₃ et comportant éventuellement un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F ;
- étant entendu que l'un au moins des radicaux R et R' est, ou comporte, un ou plusieurs, de préférence de 1 à 3, groupements trifluorométhyle (CF₃).

6- Procédé selon la revendication 5, dans lequel l'époxyde de formule (I) est tel que R' est H ou un alkyle linéaire en C₁, C₂ ou C₃, de préférence R' est H ou alkyle en C₁ éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogènes, de préférence par 3 atomes de F.

7- Procédé selon la revendication 5 ou 6 , dans lequel, à la formule (I), les groupes R sont choisis parmi les groupes suivants :

- alkyles linéaires ou ramifiés, comportant de 1 à 10 C, de préférence de 1 à 6 C, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F ;
- cycloalkyle comportant de 3 à 10 C, de préférence de 3 à 8 C, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F ;
- phényle ou naphtyle, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F ;

- aralkyle comportant de 7 à 18 C, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, tels que Cl, F, Br, de préférence F.

8- Procédé selon l'une des revendications 5 à 7, dans lequel R comporte de 1 à 3
5 groupements CF₃.

9- Procédé selon l'une des revendications 5 à 8, dans lequel R est un phényle substitué par de 1 à 3 groupes choisis parmi trifluorométhyle, trifluorométhoxy et trifluorométhylthio.

10

10- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel l'époxyde est un mélange d'énantiomères (R) et (S).

15

12- Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, dans lequel on effectue une hydrolyse d'époxyde avec un coefficient d'enantiosélectivité supérieur ou égal à 10, de préférence supérieur ou égal à 30.

20

13- Procédé selon la revendication 10 ou 11, dans lequel on effectue une hydrolyse énantiosélective et l'on produit un mélange enrichi en l'un des isomères et en diol correspondant à l'autre isomère.

25

14- Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, dans lequel on produit une préparation enrichie en époxyde (S) et en diol (R).

15- Procédé selon la revendication 14, dans lequel, à l'issue de la réaction d'hydrolyse, on sépare le diol (R) de l'époxyde (S), et l'on récupère ce dernier.

30

16- Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, dans lequel on produit une préparation enrichie en époxyde (R) et en diol (S).

17- Procédé selon la revendication 16, dans lequel, à l'issue de la réaction d'hydrolyse, on sépare le diol (S) de l'époxyde (R), et l'on récupère ce dernier.

35

18- Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, dans lequel on produit une préparation enrichie en diol (R), et, à l'issue de la réaction d'hydrolyse, on sépare l'époxyde (S) du diol (R), et l'on récupère ce dernier.

5 19- Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, dans lequel on produit une préparation enrichie en diol (S), et, à l'issue de la réaction d'hydrolyse, on sépare l'époxyde (R) du diol (S), et l'on récupère ce dernier.

10 20- Procédé selon l'une des revendications 1 à 11 et 13, dans lequel on effectue une hydrolyse d'époxyde avec un coefficient d'enantiosélectivité inférieur à 10.

21- Procédé selon la revendication 20, dans lequel on effectue l'hydrolyse des isomères (R) et (S) et l'on produit un diol racémique ou non racémique.

15 22- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21, dans lequel l'époxyde est en solution dans un solvant organique miscible à l'eau.

20 23- Procédé selon la revendication 22, dans lequel ce solvant est choisi parmi le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide, l'acétone, le tétrahydrofurane, le dioxane, le propanol, et leurs mélanges.

24- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21, dans lequel l'époxyde est en solution dans un solvant organique non miscible à l'eau.

25 25- Procédé selon la revendication 24, dans lequel ce solvant est choisi parmi l'iso-octane, l'hexane, les cycloalcanes, les aromatiques et leurs mélanges.

30 26- Procédé selon la revendication 24 ou 25, dans lequel une émulsion est formée entre la solution organique d'époxyde et une solution aqueuse de la protéine à activité EH.

27- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 26, dans lequel la protéine à activité EH est en solution aqueuse.

35 28- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 et 14 à 20, pour produire un excès énantiomérique en époxyde (R) ou (S) supérieur ou égal à 97 %.

29- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, dans lequel on produit une préparation énantiopure ou énantiomériquement enrichie en époxyde ou diol (R) ou (S), l'époxyde ou le diol étant unproduit pharmaceutique, phytosanitaire ou agrochimique ou un intermédiaire de produit pharmaceutique, phytosanitaire ou agrochimique.

LISTE DE SEQUENCES

5 <110> RHODIA CHIMIE
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 10 <120> PROCEDE DE TRANSFORMATION D'EPOXYDES PORTEURS DE GROUPES
 TRIFLUOROMETHYLE
 15 <130> BFF 03P0374
 20 <140> .
 <141>
 25 <160> 2
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 30 <210> 1
 <211> 1197
 <212> ADM
 <213> Aspergillus niger
 35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1197)
 Séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1
 40 <400> 1
 atg tcc gct ccg ttc gcc aag ttt ccc tcg tcg gcg agc att tcg cct 48
 Met Ser Ala Pro Phe Ala Lys Phe Pro Ser Ser Ala Ser Ile Ser Pro
 1 5 10 15
 45 aat cct ttc acg gtc tct atc ccg gat gaa cag ttg gat gac ttg aaa 96
 Asn Pro Phe Thr Val Ser Ile Pro Asp Glu Gln Leu Asp Asp Leu Lys
 20 25 30
 50 acc ctc gtc cga ctg tcc aag att gct cct ccc acc tat gag agc ctg 144
 Thr Leu Val Arg Leu Ser Lys Ile Ala Pro Pro Thr Tyr Glu Ser Leu
 35 40 45
 55 caa gcg gat ggc cgg ttt ggc atc act tct gaa tgg ctg aca act atg 192
 Gln Ala Asp Gly Arg Phe Gly Ile Thr Ser Glu Trp Leu Thr Thr Met
 50 55 60
 60 cgg gag aaa tgg ctc tcg gag ttt gac tgg cga cca ttt gaa gct cga 240
 Arg Glu Lys Trp Leu Ser Glu Phe Asp Trp Arg Pro Phe Glu Ala Arg
 65 70 75 80
 65 ctg aac tct ttc cct cag ttt act aca gag atc gag ggt ctc acg att 288
 Leu Asn Ser Phe Pro Gln Phe Thr Thr Glu Ile Glu Gly Leu Thr Ile
 85 90 95
 70 cac ttt gct gct ctc ttc tcc gag agg gag gat gct gtg cct atc gca 336
 His Phe Ala Ala Leu Phe Ser Glu Arg Glu Asp Ala Val Pro Ile Ala
 100 105 110
 75 ttg ctc cat ggt tgg ccc ggc agc ttc gtt gag ttc tac cca atc ctg 384
 Leu Leu His Gly Trp Pro Gly Ser Phe Val Glu Phe Tyr Pro Ile Leu
 115 120 125

	cag cta ttc cgg gag gag tac acc cct gag act ctg cca ttc cat ctg Gln Leu Phe Arg Glu Glu Tyr Thr Pro Glu Thr Leu Pro Phe His Leu 130 135 140	432
5	gtt gtt ccg tcc ctt cct ggg tat act ttt tca tct ggt ccc ccc ctg Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Gly Pro Pro Leu 145 150 155 160	480
10	gac aag gac ttc ggc ttg atg gac aac gcc cgg gtc gta gac cag ttg Asp Lys Asp Phe Gly Leu Met Asp Asn Ala Arg Val Val Asp Gln Leu 165 170 175	528
15	atg aag gac ctc ggg ttc gga agt ggt tat att att cag gga ggt gat Met Lys Asp Leu Gly Phe Gly Ser Gly Tyr Ile Ile Gln Gly Gly Asp 180 185 190	576
20	att ggt agc ttt gtt gga cga ctg ttg ggc gtg ggt ttc gac gcc tgc Ile Gly Ser Phe Val Gly Arg Leu Leu Gly Val Gly Phe Asp Ala Cys 195 200 205	624
25	aaa gcg gtt cat ttg aac ctg tgc gca atg agg gct ccc cct gag ggc Lys Ala Val His Leu Asn Leu Cys Ala Met Arg Ala Pro Pro Glu Gly 210 215 220	672
30	ccg tca att gag agc ttg tcc gca gcg gag aag gag gga atc gcg cga Pro Ser Ile Glu Ser Leu Ser Ala Ala Glu Lys Glu Gly Ile Ala Arg 225 230 235 240	720
35	atg gag aag ttc atg acc gat ggc tta gct tat gtc atg gag cac agt Met Glu Lys Phe Met Thr Asp Gly Leu Ala Tyr Ala Met Glu His Ser 245 250 255	768
40	act cgg ccc agt act att ggc cac gtg ctg tcc agc agt ccg atc gca Thr Arg Pro Ser Thr Ile Gly His Val Leu Ser Ser Pro Ile Ala 260 265 270	816
45	tta ctt gca tgg att ggt gag aaa tat ctc caa tgg gtg gat aaa ccc Leu Leu Ala Trp Ile Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Trp Val Asp Lys Pro 275 280 285	864
50	ctc cct tct gag acc atc ctc gag atg gtg agc ctg tat tgg ctg acg Leu Pro Ser Glu Thr Ile Leu Glu Met Val Ser Leu Tyr Trp Leu Thr 290 295 300	912
55	gaa agt ttc ccg cgg gca att cat acc tac cgc gag act acc cca act Glu Ser Phe Pro Arg Ala Ile His Thr Tyr Arg Glu Thr Thr Pro Thr 305 310 315 320	960
60	gcc tcc gct ccc aat gga gcg aca atg ctt cag aag gaa tta tat att Ala Ser Ala Pro Asn Gly Ala Thr Met Leu Gln Lys Glu Leu Tyr Ile 325 330 335	1008
	cac aag ccg ttt ggg ttc tcc ttc ccc aag gac ctt tgt cct gtg His Lys Pro Phe Gly Phe Ser Phe Phe Pro Lys Asp Leu Cys Pro Val 340 345 350	1056
	cct cgg agc tgg att gct aca acg gga aat cta gta ttc ttc cgg gat Pro Arg Ser Trp Ile Ala Thr Thr Gly Asn Leu Val Phe Phe Arg Asp 355 360 365	1104

cat gca gag gga gga cac ttt gcc gca ttg gag cgt cca cgc gag ctg 1152
 His Ala Glu Gly Gly His Phe Ala Ala Leu Glu Arg Pro Arg Glu Leu
 370 375 380
 5 aag acc gac ctg aca gca ttt gtc gag cag gtg tgg cag aag tag 1197
 Lys Thr Asp Leu Thr Ala Phe Val Glu Gln Val Trp Gln Lys
 385 390 395
 10 Séquence peptidique SEQ ID NO : 2
 <210> 2
 <211> 399
 <212>
 <213> Aspergillus niger
 15
 <400> 2
 Met Ser Ala Pro Phe Ala Lys Phe Pro Ser Ser Ala Ser Ile Ser Pro
 1 5 10 15
 20 Asn Pro Phe Thr Val Ser Ile Pro Asp Glu Gln Leu Asp Asp Leu Lys
 20 25 30
 Thr Leu Val Arg Leu Ser Lys Ile Ala Pro Pro Thr Tyr Glu Ser Leu
 35 40 45
 25 Gln Ala Asp Gly Arg Phe Gly Ile Thr Ser Glu Trp Leu Thr Thr Met
 50 55 60
 30 Arg Glu Lys Trp Leu Ser Glu Phe Asp Trp Arg Pro Phe Glu Ala Arg
 65 70 75 80
 Leu Asn Ser Phe Pro Gln Phe Thr Thr Glu Ile Glu Gly Leu Thr Ile
 85 90 95
 35 His Phe Ala Ala Leu Phe Ser Glu Arg Glu Asp Ala Val Pro Ile Ala
 100 105 110
 Leu Leu His Gly Trp Pro Gly Ser Phe Val Glu Phe Tyr Pro Ile Leu
 115 120 125
 40 Gln Leu Phe Arg Glu Glu Tyr Thr Pro Glu Thr Leu Pro Phe His Leu
 130 135 140
 45 Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Gly Pro Pro Leu
 145 150 155 160
 Asp Lys Asp Phe Gly Leu Met Asp Asn Ala Arg Val Val Asp Gln Leu
 165 170 175
 50 Met Lys Asp Leu Gly Phe Gly Ser Gly Tyr Ile Ile Gln Gly Asp
 180 185 190
 Ile Gly Ser Phe Val Gly Arg Leu Leu Gly Val Gly Phe Asp Ala Cys
 195 200 205
 55 Lys Ala Val His Leu Asn Leu Cys Ala Met Arg Ala Pro Pro Glu Gly
 210 215 220
 60 Pro Ser Ile Glu Ser Leu Ser Ala Ala Glu Lys Glu Gly Ile Ala Arg
 225 230 235 240

Met Glu Lys Phe Met Thr Asp Gly Leu Ala Tyr Ala Met Glu His Ser
245 250 255

5 Thr Arg Pro Ser Thr Ile Gly His Val Leu Ser Ser Ser Pro Ile Ala
260 265 270

Leu Leu Ala Trp Ile Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Trp Val Asp Lys Pro
10 275 280 285

Leu Pro Ser Glu Thr Ile Leu Glu Met Val Ser Leu Tyr Trp Leu Thr
290 295 300

15 Glu Ser Phe Pro Arg Ala Ile His Thr Tyr Arg Glu Thr Thr Pro Thr
305 310 315 320

Ala Ser Ala Pro Asn Gly Ala Thr Met Leu Gln Lys Glu Leu Tyr Ile
325 330 335

20 His Lys Pro Phe Gly Phe Ser Phe Phe Pro Lys Asp Leu Cys Pro Val
340 345 350

Pro Arg Ser Trp Ile Ala Thr Thr Gly Asn Leu Val Phe Phe Arg Asp
25 355 360 365

His Ala Glu Gly Gly His Phe Ala Ala Leu Glu Arg Pro Arg Glu Leu
370 375 380

30 Lys Thr Asp Leu Thr Ala Phe Val Glu Gln Val Trp Gln Lys
385 390 395

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1..

INV

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

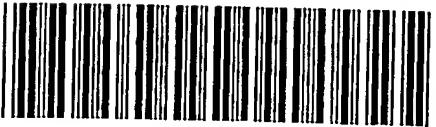
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103

Vos références pour ce dossier (<i> facultatif</i>)	AC/DL BFF 03P0374 (R03133)										
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0312190										
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)											
Procédé de transformation d'époxydes porteurs de groupes trifluorométhyle											
LE(S) DEMANDEUR(S) :											
RHODIA CHIMIE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)											
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :											
<table border="1"> <tr> <td>1 Nom</td> <td>DEREGNAUCOURT</td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td>Justine Sophie</td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>13007 MARSEILLE</td> </tr> <tr> <td>Société d'appartenance (<i> facultatif</i>)</td> <td>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)</td> </tr> </table>		1 Nom	DEREGNAUCOURT	Prénoms	Justine Sophie	Adresse	Rue	Code postal et ville	13007 MARSEILLE	Société d'appartenance (<i> facultatif</i>)	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)
1 Nom	DEREGNAUCOURT										
Prénoms	Justine Sophie										
Adresse	Rue										
Code postal et ville	13007 MARSEILLE										
Société d'appartenance (<i> facultatif</i>)	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)										
<table border="1"> <tr> <td>2 Nom</td> <td>ARCHELAS</td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td>Alain</td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>13011 MARSEILLE</td> </tr> <tr> <td>Société d'appartenance (<i> facultatif</i>)</td> <td>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)</td> </tr> </table>		2 Nom	ARCHELAS	Prénoms	Alain	Adresse	Rue	Code postal et ville	13011 MARSEILLE	Société d'appartenance (<i> facultatif</i>)	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)
2 Nom	ARCHELAS										
Prénoms	Alain										
Adresse	Rue										
Code postal et ville	13011 MARSEILLE										
Société d'appartenance (<i> facultatif</i>)	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)										
<table border="1"> <tr> <td>3 Nom</td> <td>FURSTOSS</td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td>Roland</td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>"La Panousienne" 26 Chemin des Chalets 13019 MARSEILLE</td> </tr> <tr> <td>Société d'appartenance (<i> facultatif</i>)</td> <td>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)</td> </tr> </table>		3 Nom	FURSTOSS	Prénoms	Roland	Adresse	Rue	Code postal et ville	"La Panousienne" 26 Chemin des Chalets 13019 MARSEILLE	Société d'appartenance (<i> facultatif</i>)	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)
3 Nom	FURSTOSS										
Prénoms	Roland										
Adresse	Rue										
Code postal et ville	"La Panousienne" 26 Chemin des Chalets 13019 MARSEILLE										
Société d'appartenance (<i> facultatif</i>)	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)										
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.											
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)											
CABINET LAVOIX MANDATAIRE Alain COLOMBET CPI N° 95-0306											



FR 04 2627



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.